

UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS VON
ANTI HISTAMINIKA
IM BIOLOGISCHEN MATERIAL

Ludwig v. Meyer

UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS VON ANTIHISTAMINIKA
IM BIOLOGISCHEN MATERIAL

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur
Erlangung des Doktorgrades
vorgelegt
von
Ludwig v. Meyer
aus
Bad Elster

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fachbereichen der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung:

5. 2. 1975

Vorsitzender der kommissarischen
Promotionskommission:

Prof. Dr. H. Behrens

Erstberichterstatter:

Prof. Dr. O. Dann

Zweitberichterstatter:

Prof. Dr. G. Hauck

Die vorliegende Arbeit wurde an den Instituten für Rechtsmedizin der Universitäten Freiburg und München angefertigt.

Herrn Prof. Dr. G. H a u c k möchte ich für die Überlassung des Themas und die jederzeit freundliche Unterstützung danken.

Herrn Prof. Dr. O. D a n n , Direktor des Instituts für Angewandte Chemie, Erlangen, gilt mein aufrichtiger Dank für die Nostrifizierung der Arbeit.

Dank schulde ich auch Herrn Prof. Dr. W. S p a n n , Direktor des Instituts für Rechtsmedizin, München, für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeit in Freiburg und München.

Untersuchungen zum Nachweis von Antihistaminika im biologischen Material

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Definition, Struktur und Einteilung der Antihistaminika	2
1.1.1.	Definition	2
1.1.2.	Grundstruktur	2
1.1.3.	Einteilung	2
2.	Methoden der Literatur zum Nachweis der Antihistaminika	7
2.1.	Verfahren zur Gruppentrennung und zur Anreicherung	7
2.1.1.	Extraktion	7
2.1.2.	Ionenpaarextraktion	8
2.1.3.	Verschiedene Isolierungsverfahren	8
2.2.	Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung	9
2.2.1.	Fällungs- und Farbreaktionen	9
2.2.2.	Kolorimetrie	10
2.2.3.	UV-Spektrophotometrie	11
2.2.3.1.	Derivatbildung	12
2.2.4.	Spektrofluorimetrie	12
2.2.5.	Infrarotspektrophotometrie	12
2.2.6.	Papierchromatographie	13
2.2.7.	Dünnschichtchromatographie	13
2.2.7.1.	Anwendung der DC zum Nachweis der Antihistaminika	13

2.2.7.2.	Detektionsmittel	15
2.2.7.3.	Gebräuchliche Fließmittel	16
2.2.8.	Gaschromatographie	18
2.2.8.1.	Derivatbildung	20
2.2.9.	Verschiedene Nachweismethoden	20
2.3.	Stoffwechsel der Antihistaminika	21
2.4.	Ergebnis der Literaturübersicht	26
3.	Eigene Untersuchungen	28
3.1.	Extraktion aus wässrigen Lösungen	28
3.2.	Ultraviolettspektrophotometrie	30
3.3.	Infrarotspektrophotometrie	33
3.4.	Dünnschichtchromatographie	41
3.5.	Gaschromatographie	43
3.5.1.	Arbeitsbedingungen	43
3.5.2.	Erzielte Trennungen	46
3.6.	Nachweis im biologischen Medium	56
3.6.1.	Auswahl des Detektors	56
3.6.2.	Untersuchungen zur Nachweisbarkeit von Antihistaminika im Urin	59
3.6.2.1.	Versuche zur Nachweisbarkeit im Urin nach therapeutischer Dosierung	59
3.6.2.2.	Versuche zur selektiven Extraktion einiger Antihistaminika	62
3.6.2.3.	Versuche zur Aufstellung einer Eichkurve für zwei Antihistaminika nach Dichlormethanextraktion	64
3.6.2.4.	Bestimmung der Ausscheidung von Bamipin und Chlorphenoxamin im Urin	70
3.6.2.4.1.	Aufstellung der Eichkurven mit Pentan/2-Methylbutanol(1) Extraktion	70

3.6.2.4.2.	Versuche nach Drageeinnahme	70
3.6.2.5.	Bestimmung der Ausscheidung von Dimetinden im Urin	74
3.7.	Arbeitsvorschriften	77
4.	Diskussion	80
5.	Zusammenfassung	82
6.	Literaturverzeichnis	83

1. EINLEITUNG

Die Entdeckung der ersten als Histaminantagonist wirksamen Verbindung durch Bovet und Staub im Jahre 1937 führte in den vierziger und fünfziger Jahren zur Entwicklung zahlreicher Antihistaminika. Sie wurden damals bevorzugt zur Behandlung allergischer Erkrankungen eingesetzt. Auf diesem Gebiet erweisen sich die Corticosteroide als wirksamer, so daß die Antihistaminika als Antiallergika nur noch selten verwendet werden. Sie werden jedoch häufiger in Kombinationen mit anderen Stoffen als Antiemetika, Antitussiva, Sedativa und zur Schleimhautabschwellung in Grippe- und Schnupfenmitteln benutzt. Über die Pharmakologie und den klinischen Gebrauch sind zahlreiche Arbeiten veröffentlicht worden. Über die Nachweisbarkeit aus biologischem Material und den Metabolismus liegen nur bei wenigen Antihistaminika Angaben vor. Dies dürfte zum Teil darin begründet sein, daß die meisten Stoffe zwischen 1945 und 1955 eingeführt wurden. Die Bedeutung der Pharmakokinetik war damals erst teilweise bekannt. Soweit Versuche aus dieser Zeit vorliegen, sind sie heute nur noch von geringem Wert. Die damaligen Analysenverfahren besaßen weder die Empfindlichkeit noch die Spezifität, die heute verlangt wird.

Der Nachweis dieser Substanzen ist nicht nur für die Pharmakologie und die Toxikologie von Bedeutung. In zunehmendem Maße wird bei Verkehrsdelikten die Einnahme von Tabletten als Grund des Fehlverhaltens genannt. Antihistaminika wirken häufig auch in normaler Dosis sedierend. Sie sind, vor allem in Kombination mit Alkohol, geeignet, die Fahrtauglichkeit zu beeinflussen. Um die Angaben über die Einnahme bestätigen zu können, ist der Nachweis dieser Arzneistoffe von großer Wichtigkeit.

1.1. Definition, Struktur und Einteilung der Antihistaminika

1.1.1. Definition

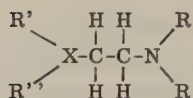
Antihistaminika gehören keiner einheitlichen Stoffklasse an. Eine mögliche Definition ist folgende:

Antihistaminika sind Stoffe verschiedener chemischer Struktur, deren Charakteristikum ist, daß sie bei relativ geringen Konzentrationen bzw. Dosen an isolierten Organen und im Gesamtorganismus Wirkungen des Histamins aufzuheben bzw. zu verhindern vermögen. (H. FRIEBEL nach 61)

1.1.2. Grundstruktur

Im Formenbild der meisten Antihistaminika läßt sich, wie auch im Histamin, eine Äthylamingruppe finden.

Als Grundgerüst kann folgende Formel gelten:

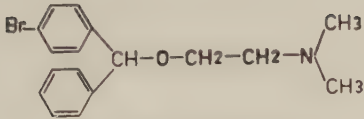
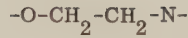


X kann ein N, O oder C-Atom sein

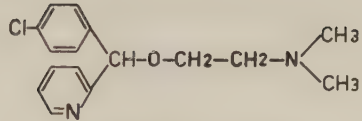
Diese Gruppierung kann in einer Kette oder einer Ringstruktur eingebaut vorkommen.

1.1.3. Einteilung

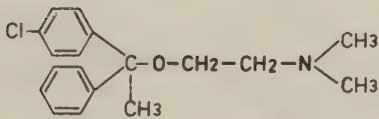
Eine Einteilung in sechs Gruppen ist möglich (143), wobei die in dieser Arbeit behandelten zugeordnet werden.

Äthanolamin-Derivate

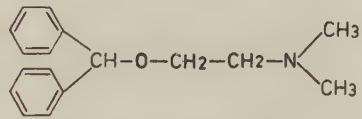
Bromazin (INN)



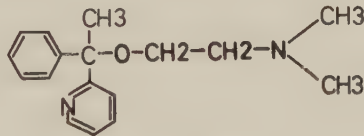
Carbinoxamin (INN)



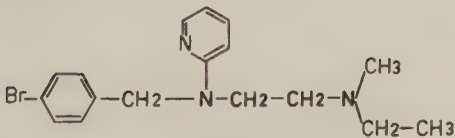
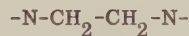
Chlorphenoxamin (INN)



Diphenhydramin (INN)

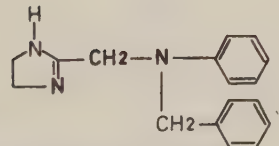


Doxylamin (INN)

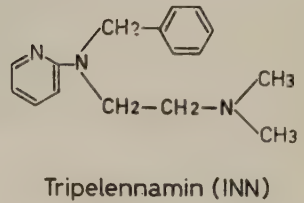
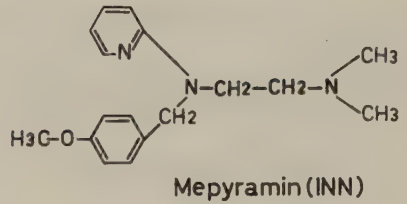
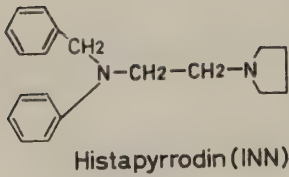
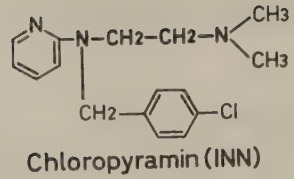
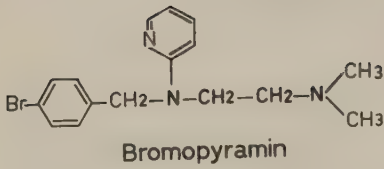
Äthylendiamin-Derivate

N-p-Brombenzyl-N-α-pyridyl-N'-äethyl-N'-methyl-äethylendiamin

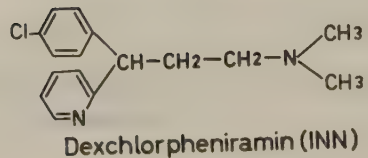
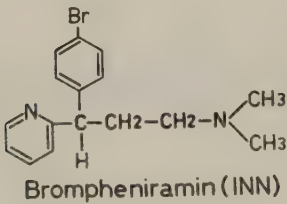
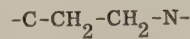
Adeptolon (R)

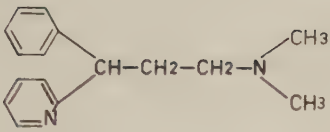


Antazolin (INN)

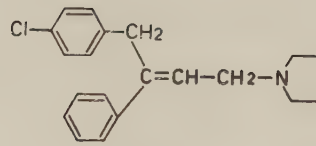


Alkylamin-Derivate



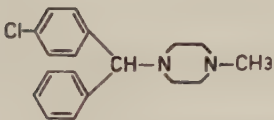
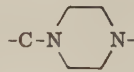


Pheniramin (INN)

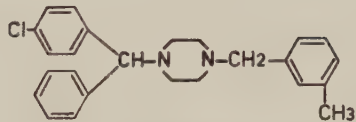


Pyrrobutamin

Piperazin-Derivate

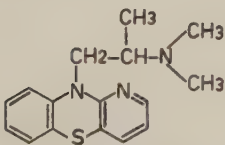


Chlorcyclizin (INN)

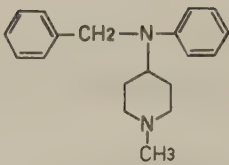
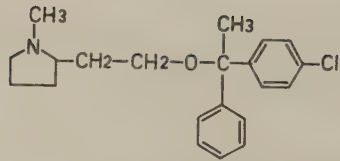
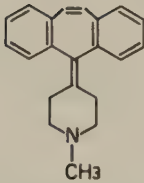
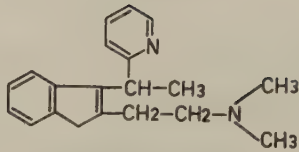
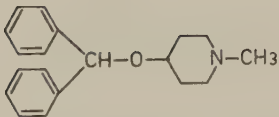
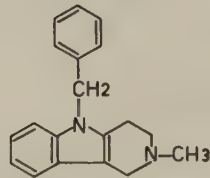
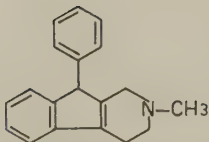
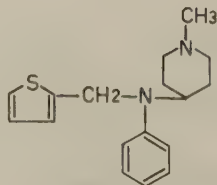


Meclozin

Phenothiazin-Derivate



Isothipendyl (INN)

Verschiedene**Bamipin (INN)****Clemastin (INN)****Cyproheptadin (INN)****Dimetinden (INN)****Diphenylpyralin (INN)****Mebhydrolin (INN)****Phenindamin (INN)****Thenalidin (INN)**

2. METHODEN DER LITERATUR ZUM NACHWEIS DER ANTIHISTAMINIKA

2.1. Verfahren zur Gruppentrennung und zur Anreicherung

2.1.1. Extraktion

Allen Antihistaminika ist gemeinsam, daß sie basischen Charakter haben und sich wie Alkaloide verhalten. Sie sind mit lipophilen Lösungsmitteln aus alkalischem Medium ausschüttelbar.

In der Regel wird Äther oder Chloroform zur Extraktion benutzt. Zur Isolierung aus Gewebe werden von verschiedenen Autoren (51, 63, 69, 87) Modifikationen der Stas-Otto-Methode benutzt. Das Homogenisat wird nach Ansäuern mit Weinsäure oder Salzsäure mit Alkohol extrahiert. Der Alkohol wird abgedampft, und der wässrige Rückstand nach dem Alkalisieren direkt oder nach zusätzlichen Reinigungsmaßnahmen mit Äther bzw. Chloroform ausgeschüttelt.

Neben den gebräuchlichen Extraktionsmitteln werden zur Gewinnung sauberer Extrakte und besserer Ausbeuten auch andere lipophile Lösungsmittel verwendet. SCOTT (120) isoliert Methapyrilen aus Zubereitungen nach Alkalisieren mit Petroläther. Die Extraktion aus Urin mit n-Heptan beschreiben CHENG-CHUN LEE (29) für Chlorpheniramin und Diphenhydramin; DILL u. GLAZKO (40) für Diphenhydramin; KABASALIKIAN, TAGGART u. TOWNLEY (70) für Pheniramin, Brompheniramin und Chlorpheniramin. Die Isolierung mit n-Hexan benutzen KAMM, FIRULIO, MILLER u. VAN LOON (72) für Chlorpheniramin in Urin.

Dichlormethan verwenden WIDMANN, EIDEN u. TENCZER (138) zur Extraktion von Chlorphenamin aus pharmazeutischen Zubereitungen; BECKETT u. MOFFAT (11) zur Extraktion von Antihistaminika und anderen basischen Arzneimitteln aus Urin.

Äthylendichlorid benutzen DRACH u. HOWELL (42) zur Isolierung von Diphenhydramin aus Urin bei pH 8,4; NARROD, WILK u. KING (96) zur Gewinnung von Meclozin aus Gewebe. Bei Serum empfehlen die letztgenannten

Autoren wegen der besseren Ausbeute ein Gemisch von Aceton-Äthylendichlorid (1 : 4).

Dichlormethan-Äther-Gemisch benutzen LUDERS, WILLIAMS, FRIED, REHM u. TISCHLER (83) im Verhältnis 1 : 4 zur Isolierung von Tripeleminamin aus Milch; DIEKMANN, HÖSEMANN u. DIBBERN (39) im Verhältnis 1 : 3 zur Extraktion von Pheniramin aus Urin.

COCHIN u. DALY (32) isolieren verschiedene Antihistaminika und Phentiazine bei pH 9,0 aus Urin mit dem vierfachen Volumen Äthylendichlorid, das 10 % Isoamylalkohol enthält.

Ein Aceton-Äther Gemisch empfehlen JAIN u. KIRK (68) für ihre Arzneimittel-extraktionsmethode aus Blut. DAVIDOW, LI PETRI u. QUAME (38) verzichten auf jede Gruppentrennung und extrahieren saure und basische Arzneimittel aus Urin für ihr Screeningverfahren bei pH 9,5 mit Chloroform-Isopropanol 96 : 4.

2.1.2. Ionenpaarextraktion

Neben der Isolierung der Antihistaminika durch Extraktion der Basen wird auch die Ionenpaarextraktion angewandt. ALBERT u. WINDHEUSER (3) bringen einen Ätherextrakt auf eine mit einem saurem Puffer beladene Säule, von dem Chlorpheniramin mit Chloroform eluiert wird. HUGOSSON, NYBERG u. NILSSON (67) schütteln Brompheniramin als Pikrat bei pH 5,2 in Chloroform aus.

RADER (111) benutzt die Ionenpaarverteilungschromatographie an einer p-Toluolsulfonsäure-Kaliumchlorid-Säule zur Isolierung von Chlorpheniramin und Methapyrilen aus pharmazeutischen Zubereitungen.

2.1.3. Verschiedene Isolierungsverfahren

EL-GENDI, KISSER u. MACHATA (43) isolieren die Basen, darunter Tripeleminamin durch Fällung mit Tetraphenylborat bei pH 3,0-3,5 nach vorangegangener Acetonfällung.

LANGE, THEODORE u. PRUYN (81) geben ein Verfahren zum Nachweis von Chlorpheniramin an, bei dem das Blut enteiweißt und der Überstand nach Zentrifugieren direkt zur Dünnschichtchromatographie eingesetzt wird.

Isolierung mittels Austauscherharze, die vorwiegend in den USA zur Routineuntersuchung von Drogenabhängigen angewandt wird, hat man auch zur Untersuchung von Antihistaminika herangezogen (MULE, BASTOS, JUKOFSKY u. SAFFER 95).

SMITH (122) trennt Antihistaminika aus Zubereitungen durch Retention auf einer sulfonierten Polystyrolharzsäule ab.

2.2. Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung

2.2.1. Fällungs- und Farbreaktionen

Für die Identifizierung der Antihistaminika sind zahlreiche chemische und physikalische Methoden eingesetzt worden. Zu den ältesten und am einfachsten durchzuführenden Nachweisen gehören die Farb- und Fällungsreaktionen.

AUTERHOFF (6, 7, 8, 97) macht in seinen 4 Mitteilungen aus den Jahren 1950, 1951, 1952 und 1955 Angaben über die chemischen und physikalischen Reaktionen der damals gebräuchlichen Antihistaminika. Er behandelt Reinsubstanzen mit den üblichen Alkaloidfällungs- und Farbreagenzien und gibt zur weiteren Charakterisierung Spezialreaktionen an.

OSOL und SIDERI (102) beschreiben 1955 für die in der US-Pharmakopoe XV enthaltenen 13 Antihistaminika einen einfachen Farbttest mit Schwefelsäure. Die Reaktion vor und nach Verdünnen mit Wasser soll eine Identifizierung ermöglichen.

CLARKE (30) benutzt 1957 Mikrokristall- und Farbtteste zur Identifizierung von 39 Antihistaminika. Die benötigten Mengen liegen nach seinen Angaben im μg -Bereich.

Eine Zusammenstellung der verschiedenen chemischen und physikalischen Reaktionen von Antihistaminika, wie sie in Arzneibuchartikeln benutzt wurden, findet sich in dem ersten Band von HAGER'S HANDBUCH DER PHARMAZEUTISCHEN PRAXIS (61).

Die Benutzung der Koflerschen Thermomikromethoden zur Identifizierung von 38 Antihistaminika beschreiben BRANDSTÄTTER-KUHNERT u. Mit. (17). Identitätsreaktionen von Isothipendyl und Diphenylpyralin geben YALCINDAG u. ONUR (144, 145) in zwei Arbeiten aus dem Jahr 1968 an.

Schmelzpunktsbestimmung nach Derivatbildung mit verschiedenen Arylsulfon-

säuren empfehlen ZAKREWSKI u. ZAPOR (146) 1970 zur Identifizierung von Chloropyramin, Antazolin und Diphenhydramin.

FULTON (49) gibt in seiner Monographie Mikrokristallreaktionen für Isothipendyl, Methapyrilen und Tripelelennamin an.

Eine umfangreiche Untersuchung über die Spezifität mikrochemischer Kristallreaktionen stammt von HAUCK und SCHMIDT (65, 118). In dieser Arbeit sind die Reaktionen von 27 Fällungsreagenzien mit 24 Antihistaminika, Barbituraten, bromhaltigen Harnstoffderivaten, Lokalanästhetika, Alkaloiden, Sympathikomimetika und Diuretika aufgeführt. Sie kommen zu dem Ergebnis, daß die in der Literatur empfohlenen Reagenzien nicht gruppenspezifisch sind. Bei Anwendung mehrerer Reagenzien sollen die Mikrokristallreaktionen ausreichend sichere Ergebnisse liefern.

2.2.2. Kolorimetrie

Die quantitative Bestimmung der Antihistaminika wird vor allem in älteren Arbeiten häufig über einen Farbkomplex vorgenommen.

Sehr verbreitet war das Verfahren von BRODIE u. UDENFRIEND (19), bei dem der Komplex aus organischer Base und Methylorange in ein organisches Lösungsmittel ausgeschüttelt wurde. DILL und GLAZKO (40) beschrieben eine Anwendung zur Bestimmung von Diphenhydramin.

Statt Methylorange werden noch andere Komplexe und Ionenpaarbildner angegeben, z.B. Tropäolin-OO (60), Plasmocorin B (101), Metallindikator NN (77), Bromthymolblau (88), Pikratlösung (67).

BANDELIN, SLIFER u. PANKRATZ (10) bestimmen Antihistaminika in Zubereitungen, indem sie die Reineckesalz-fällung in Aceton lösen und kolorimetrieren.

PLUMMER (109) schätzt die Tripelelennaminkonzentration im Blut auf Grund der Trübung, die bei der Zugabe von Jodlösung zu dem in Schwefelsäure aufgenommenen Ätherextrakt entsteht.

PANTLITSCHKO, BENDER u. SCHMID (103) bestimmen Antazolin im Blut durch die Kupplungsreaktion mit einem Diazoniumsalz.

Ähnlich wie die Phenothiazine reagiert auch Isothipendyl mit Palladiumchlorid zu einer gefärbten Komplexverbindung, was MEYER (90) zur quantitativen Bestimmung benützt.

Kolorimetrische Verfahren werden sowohl wegen der oftmals nicht ausreichenden Empfindlichkeit als auch vor allem wegen der geringen Spezifität nur noch selten benutzt.

2.2.3. UV-Spektrophotometrie

Die UV-Spektrophotometrie ist für die qualitative und quantitative Bestimmung der Antihistaminika geeignet, die auf Grund von mehreren aromatischen oder heterocyclischen Ringen im Molekül hohe Absorptionen im ultravioletten Bereich aufweisen. Eine sichere Identifizierung allein durch das UV-Spektrum ist nicht möglich.

NEUHOFF u. AUTERHOFF (97) verwendeten die Methode zur Ergänzung ihres Schemas von Farb- und Fällungsreaktionen.

Ebenso wie SORG (124) verweisen sie auf Zusammenhänge zwischen chemischem Aufbau und Absorptionsspektrum.

Für die US-Pharmakopoe XV, die zur Identifizierung und Gehaltsbestimmung von Antihistaminika als Reinsubstanzen und in der Zubereitung die UV-Spektroskopie heranzieht, haben KLECKNER u. OSOL (76) die UV-Spektren von acht Antihistaminika in alkoholischer Lösung und bei verschiedenen pH-Werten untersucht.

Über ähnliche Studien an Antihistaminika und MAO-Hemmern berichten PELLERIN u. EL MAKKAWI (105).

Zur Bestimmung von einem oder mehreren Antihistaminika in Arzneimittelzubereitungen wird die UV-Spektrophotometrie häufig eingesetzt (4, 57, 108, 111, 122, 138, 142).

MACHATA (87), CAVALLITO, CHAFETZ u. MILLER (25) und RIEDERS u. CORDOVA (114) benutzen die Methode zur Bestimmung in biologischem Material. Die Reinigung der Extrakte erfolgt durch Rückextraktion oder Waschen mit Puffer. Meistens ist jedoch eine weitgehende Reinigung und Auftrennung notwendig.

EL GENDI, KISSER u. MACHATA (43), DIEKMANN, HÖSEMANN u. DIBBERN (39), POSNER, GRAVES, KING u. WILK (110) und CUYPERS (36) bestimmen die gesuchte Substanz aus Harn, Blut oder Organen nach dünn-schichtchromatographischer Trennung UV-spektrophotometrisch.

Eine papierchromatographische Vorreinigung, wie sie von WEINMANN u.

GEISSMANN (137) durchgeführt wird, ist auch möglich.

2.2.3.1. Derivatbildung

Bei Basen mit Diphenylmethyläthergruppierung, wie Bromazin, Diphenhydramin und Diphenylpyralin, läßt sich eine besondere Form der Reinigung und Abtrennung durchführen.

WALLACE, BIGGS u. DAHL (134) empfehlen die saure Hydrolyse der Ätherbindungen mit Schwefelsäure und Kaliumdichromat und anschließende Wasserdampfdestillation des entstandenen Benzophenons, das eine hohe molare Absorption im ultravioletten Bereich aufweist.

WILCZYNSKA (139) führt eine ähnliche Spaltungsreaktion von Benzhydroläthern durch chlorierende Oxydation aus.

2.2.4. Spektrofluorimetrie

Die Fluoreszenz von Antihistaminika wurde nur von wenigen Autoren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung herangezogen.

HÄUSLER u. HAJDU (60) erwähnen in ihren Untersuchungen über die Tropäolinmethode, daß selbst das schwach fluoreszierende Histapyrroldin sich fluorimetrisch identifizieren läßt.

Ausführlichere Angaben über die Fluoreszenzbedingungen verschiedener Antihistaminika stammen von WILSON, WIRZ u. SCHENK (140).

Die Fluoreszenz eines Komplexes von Bengalrosa B mit Chlorphenamin verwenden LANGE, THEODORE u. PRUYN (81) zur Bestimmung der Blutkonzentration dieses Antihistaminikums.

2.2.5. Infrarotspektrophotometrie

Von den in chemisch-toxikologischen Laboratorien zur Zeit üblichen Verfahren ist der infrarotspektroskopische Nachweis die sicherste Identifizierung. Lage und Intensität der bei organischen Substanzen zahlreichen Banden ergeben eine Vielzahl von Angaben, während bei anderen Methoden nur eine Meßgröße anfällt. Der Nachteil des Verfahrens besteht darin, daß man vergleichsweise eine große Menge Substanz von hoher Reinheit benötigt.

Prinzipiell ist eine entsprechende Reinigung der aus biologischen Proben erhaltenen Extrakten möglich. Bei den geringen Mengen ist jedoch die Gefahr der Verunreinigung und der Substanzverluste so groß, daß es in der Regel bei therapeutischer Dosierung von Arzneimitteln nicht gelingt, von den Ausscheidungsprodukten in Körperflüssigkeiten ein zur Identifizierung ausreichendes Spektrum zu gewinnen. Wenn dagegen wie bei Vergiftungen größere Substanzmengen vorliegen, ist die Infrarotspektrophotometrie zu Bestätigung und Sicherung der mit anderen Methoden gefundenen Ergebnisse sehr gut geeignet.

HARDMEIER u. SCHMIDLIN-MESZAROS (63) fanden nach der tödlichen Vergiftung eines Kleinkindes mit dem Antiallergikum Plimasin^R infrarotspektroskopisch Anhaltspunkte für das Vorliegen von Tripelennamin im Extrakt des Dünndarm- und Leberextraktes.

2.2.6. Papierchromatographie

Als in den fünfziger Jahren die Papierchromatographie eine große Verbreitung fand, wurde sie auch zum Nachweis der Antihistaminika eingesetzt (28, 100).

Zahlreiche Literaturstellen zum papierchromatographischen Nachweis finden sich in der Arbeit von VECERKOVA, SULCOVA u. KACL (129), die die Umkehrphasenchromatographie im System Petroleum-Äthanol/Wasser/Ammoniak beschreiben. MACEK u. VECERKOVA (86) geben ein Verfahren der systematischen Analyse von 161 Arzneimitteln an, darunter 15 Antihistaminika. Die Vortrennung erfolgt durch Extraktion bei verschiedenen pH bzw. Ionenaustauscher. Die weitere Ordnung in Gruppen geschieht mit der Papierchromatographie, die zusammen mit der Dünnschichtchromatographie zur Identifizierung dient.

2.2.7. Dünnschichtchromatographie

2.2.7.1. Anwendung der DC zum Nachweis der Antihistaminika

Ein erster Einsatz findet sich 1962 in der Arbeit von VIDIC u. SCHÜTTE (131), die zur Ergänzung ihres papierchromatographischen Arbeitsganges (für toxikologisch wichtige basische Gift- und Arzneistoffe) die Dünnschicht-

chromatographie auf Kieselgel mit 0,1n wasserfreier methanolischer Ammoniaklösung als Fließmittel heranziehen. Wegen des geringen Zeitbedarfs und der höheren Empfindlichkeit hat diese Methode die Papierchromatographie fast vollständig verdrängt.

AWE u. SCHULZE (9) benutzen fünf Fließmittel zur systematischen Analyse von 31 Antihistaminika und 25 Phenothiazinen und Substanzen mit phenothiazinähnlichen Ringsystemen.

Für die Identifizierung der gleichen Substanzgruppen, darunter 18 Antihistaminika empfehlen COCHIN u. DALY (32) vier Laufmittelsysteme für Kieselgel und eins für Aluminiumoxyd.

MACEK u. VECERKOVA (86) geben in ihrer umfangreichen Arbeit über die systematische Analyse von 161 Arzneimitteln, die auf der Einteilung in Untergruppen durch Papierchromatographie basiert, drei Fließmittel zur Dünnschichtchromatographie von 15 Antihistaminika an. Dieses Verfahren wird hier zur Bestätigung der Identifizierung benutzt.

EL GENDI, KISSER u. MACHATA (43) verzichten bei ihrem Verfahren auf die zeit- und substanzverbrauchende Vortrennung und setzen die Extrakte oder die Niederschläge mit Tetraphenylborat direkt zur Dünnschichtchromatographie ein. Die Identifizierung geschieht mit vier Fließmitteln und anschließender UV-Spektrophotometrie.

KUNTZMANN, KLUTCH, TSAI u. BURNS (79) verwenden fünf Laufmittel zur Klärung des Metabolismus von Chlorocyclizin und Cyclizin bei Ratten. FIKE u. SUNSHINE (44) empfehlen eine Methode, die es möglich machen soll, 19 von 25 Antihistaminika dünn-schichtchromatographisch zu identifizieren. Sie benötigen hierzu 3 Fließmittelsysteme und 2 Anfärbereagenzien. In einer späteren Arbeit (45), die sich mit den Struktur-Rf-Beziehungen bei der Dünnschichtchromatographie einiger basischer Arzneimittel beschäftigt, beschreibt er für zwei weitere Fließmittel die Rf-Werte von 25 Antihistaminika. FIKE (45) verwendet für die Chromatographie basischer Substanzen unter Benutzung 0,1n Natronlauge oder 0,1n KHSO_4 -Lösung hergestellte Kieselgelschichten.

DAVIDOW, LI PETRI und QUAME (38) trennen in ihrem Screeningverfahren zur Aufdeckung von Drogenmißbrauch saure und basische Arzneistoffe auf Kieselgel in einem einzigen Fließmittel.

GOENECHEA (56) unterscheidet Antazolin und drei weitere Imidazolinderivate mittels Dünnschichtchromatographie in einem basischen Laufmittel.

LANGE, THEODORE u. PRUYN (81) beschreiben eine Mikromethode zur Bestimmung der Blutkonzentration von Chlorphenamin und 3 anderen Aralkyl-aminen. Der Nachweis der Einnahme wird durch Benutzung zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie geführt.

YALCINDAG und ONUR (145) geben in ihrer Mitteilung zur Identifizierung und Bestimmung von Diphenylpyralin vier Fließmittelsysteme an.

DRACH und HOWELL (42) weisen die Metaboliten von Diphenhydramin beim Rhesusaffen auf Kieselgelschichten in vier Fließmitteln mittels Vergleichssubstanzen nach.

Die Wirkstofffreigabe aus Depot-Weichgelatinekapselformen wird von WIDMANN, EIDEN u. TENCZER (138) unter anderem am Beispiel von Chlorphenaminmaleat gezeigt. Nach Isolierung der Wirkstoffe aus Depotkapselformen weisen sie sie durch Dünnschichtchromatographie in einem Laufmittel nach.

In seiner Arbeit über Nachweis und Beständigkeit von Arzneistoffen in Blutproben gibt VIDIC (130) für Antihistaminika und andere basische Stoffe vier Fließmittel an.

KÜCHLIN (78) hat zum Nachweis einer Reihe von Thiazol- und Phenyl-derivaten, zu denen fünf Antihistaminika gehören, verschiedene Systeme untersucht und hebt zwei als geeignet hervor.

Fünf Laufmittel aus den Untersuchungen von CUYPERS (36) zum Nachweis von Synphen^(R) (Chloropyramin) und seinen Metaboliten im menschlichen Harn lassen sich zur Identifizierung verwenden.

In den Arbeiten von MULE (94) und MULE, BASTOS, JUKOFSKY u. SAFFER (95) über den Routinenachweis von Drogenmißbrauch sind zwei Systeme für basische Stoffe angegeben. Für zwei Antihistaminika, Chlorpheniramin und Triprolidin ist der Rf-Wert angegeben.

Zur quantitativen dünnschichtchromatographischen Bestimmung von Chlorphenamin im Serum geben FISCHER, EULENHÖFER u. KRAFT (47) ein Fließmittel an, das einwandfrei von der Eiweißfront abtrennt.

Durch zweidimensionale Chromatographie in einem von COCHIN u. DALY (32) angegebenen Fließmittel und Methanol erreicht BOONEN (16) eine zufriedenstellende Identifizierung von neun Antihistaminika.

2.2.7.2. Detektionsmittel

Zur Detektion von Antihistaminika werden neben der Fluoreszenzlöschung hauptsächlich die allgemeinen Sprühreagenzien für Basen wie Jodplatt und

Dragendorff's Reagenz benutzt. Noch unspezifischer ist die Anfärbung mit Jod (45, 94, 145).

Eine Differenzierung der verschiedenen Antihistaminika mit Formalin-Schwefelsäure mit und ohne Erhitzen wird von AWE und SCHULZE (9) angegeben.

MACEK und VECERKOVA (86) besprühen die Platten vor allem zur Detektion von Phenothiazinähnlichen Ringsystemen mit 50 %iger wässriger Schwefelsäure und erhitzen anschließend auf 150° C.

MULE (94) verwendet eine Konzentration von 5 %.

FIKE (45) unterscheidet die Antihistaminika auf Grund der Reaktion mit Mandelins Reagenz (1 %ige Ammoniumvanadatlg. in H_2SO_4) in der Kälte und nach Erhitzen auf 85° C.

Die Verwendung von Eisen(III)chloridlösung allein und zur Farbverstärkung nach Dragendorffs Reagenz geben CUYERS (36), KÜCHLIN (78) und GOE-NECHEA (56) an. Der letzte Autor führt zur Identifizierung von Antazolin noch die Anfärbbarkeit mit Quecksilber(I)nitrat an.

2.2.7.3. Gebräuchliche Fließmittel

Kieselgel mit und ohne Gips	Lit.
Chloroform/Aceton 9+1	(43)
Chloroform/Äthanol 9+1	(43)
Chloroform/Äthanol 8+2	(43)
Chloroform/Äther/Äthanol 70:30:30	(36)
Methanol	(9), (16), (43)
Butanol 60:40	(32)
Methanol/Methylal 1:1	(9)
Methylal	(9)
Tetrachlorkohlenstoff/Chloroform/Methanol 5:5:1	(145)
Äthanol/Essigsäure/Wasser 50:30:20	(16), (32)
Äthanol/1n Essigsäure 20:1	(42)
Benzol/Äthanol/Wasser/Essigsäure 20:20:10:1	(79)
Essigsäure/Wasser 20:80 MORRISON und CHATTEN nach	(33)
Aceton/Methanol/ NH_3 50:50:1	(145)
Äthanol/1n Ammoniaklösung 20:1	(42)
Äthylacetat (mit Methylamin gesättigt)	(86)

Äthylacetat/Aceton 1:1 (mit Methylamin gesättigt)	(86)
Äthylacetat/Cyclohexan 7:13 (mit Methylamin gesättigt)	(86)
Äthylacetat/Methanol/Ammoniak 170:20:10	(38)
Äthylacetat/Methanol/Wasser/Ammoniak 85:10:3:1	(94)
Benzol/Aceton/ NH_3 50:50:1	(78)
Benzol/Aceton/ NH_3 20:75:5	(56)
Benzol/Aceton 3:7 (in Ammoniakatmosphäre)	(145)
Benzol/Chloroform/Diäthylamin 6:3:1	(130)
Benzol/Dioxan/Äthanol/25 %Ammoniaklösung 50:40:5:5	(47)
Benzol/Dioxan/Ammoniaklösung 60:35:5	(32)
n-Butanol/15n Ammoniaklösung 50:1	(42)
Chloroform/Äther 1+1 (in Ammoniakatmosphäre)	(81)
Chloroform/Methanol/Ammoniak 99:10:1	(94)
Chloroform/Äther/Methanol 70:30:30	(36)
Cyclohexan/Benzol/Diäthylamin 75:15:10	(44)
Cyclohexan/Benzol/Diäthylamin 45:15:10	(36)
Cyclohexan/Chloroform/Dimethylamin (40 % in H_2O) 75:60:15	(138)
Cyclohexan/Diäthylamin 9:1	(130)
Methanol (in Ammoniakatmosphäre)	(81)
Methanol mit 0,17 % Ammoniak	(131)
Methanol/Ammoniak 99:1	(31, 36, 94)
Methanol/Ammoniak 100:1,5	(16)
Methanol/Cyclohexan/Chloroform/Ammoniak 70:30:8:1	(36)
Methanol/0,15n Ammoniaklösung 1:1	(42)
Tetrachlorkohlenstoff/Aceton/Diäthylamin 90:10:2	(78)
<u>Kieselgel mit 0,1n NaOH</u>	
Aceton	(45)
Äthanol 95 %	(44)
Cyclohexan/Benzol/Diäthylamin 75:15:10	(45)
<u>Kieselgel mit 0,1m KHSO_4</u>	
Methanol	(16, 44)
<u>Aluminiumoxyd</u>	
Benzol/Methanol/Essigsäure/Wasser 20:20:1:10	(79)

Butanol/Butyläther/Essigsäure 40:80:10	(32)
Chloroform/Aceton/Ameisensäure 98 % 16:4:1	(130)
Chloroform/Methanol/Wasser/Essigsäure 20:10:10:1	(79)
Toluol/Äthanol/Wasser/Essigsäure 20:30:10:1	(79)

2.2.8. Gaschromatographie

Wegen ihrer großen Empfindlichkeit und Trennleistung ist die Gaschromatographie seit langer Zeit auf dem Gebiet der Antihistaminika eingesetzt worden.

Die Anwendung dieser Methode zum Nachweis von Dimetinden im Blut wird in einem hausinternen Bericht der Firma ZYMA-BLAES (147) aus dem Jahre 1962 beschrieben. Die Empfindlichkeit ist allerdings noch nicht ausreichend, um die extrem niedrigen Konzentrationen nach therapeutischer Dosierung zu bestimmen. In dieser Arbeit ist auch die Trennung von sechs Antihistaminika auf einer niedrig belegten Igepal 880 Säule angegeben. Statt dieser Polyätherphase, mit der symmetrische Peaks erzielt wurden, hat man wegen ihrer Temperaturbeständigkeit und universellen Einsetzbarkeit häufiger Silikonphasen angewandt (55, 64, 74, 105).

Polare und basische Substanzen zeigen auf einfachen Silikongummiderivaten ein zum Teil beträchtliches "tailing".

MAC DONALD u. PFLAUM (84) trennen 1963 16 Antihistaminika auf einer SE 30 Säule, während CELESTE u. TURCZAN (27) für die Trennung von 11 Antihistaminika eine mit 10 % Dow Corning Hochvakuum Silikonfett beladene Säule vorziehen.

FONTAN, SMITH u. KIRK (48) empfehlen eine mit 2 % Carbowax 20m und 10 % KOH belegte Säule und setzen die alkoholische Lösung der Salze zur Gaschromatographie ein. Sie berichten, daß die Retentionszeit von Salz und freier Base übereinstimmt, und führen dies auf die Dissoziation der Salze bei der benutzten Einspritzblocktemperatur von 230° C zurück. Sie geben die Retentionszeiten von 13 Antihistaminika an.

CELESTE u. POLITO (26) benutzen zur Bestimmung von 12 Antihistaminika und verwandten Stoffen in Arzneimittelzubereitungen eine Mischphase Carbowax-SE30, die auch COMETTI, BAGNASCO u. MAGGI (34) und REISS (113) zur gaschromatographischen Trennung der Begleitstoffe von Antihista-

minika in Gemischen benutzen. Zur Differenzierung ziehen die beiden letzten Autoren noch zwei Silikonphasen heran.

In ihrer Arbeit über die systematischen Anwendungen der Gas-Flüssig-Chromatographie in der Toxikologie empfehlen JAIN u. KIRK (68) für die Antihistaminika eine mit 1 % Hi-Eff 8B belegte Säule und geben für 20 Substanzen die relativen Retentionszeiten bei zwei Temperaturen an. Sie berichten über die Konzentration von sieben gebräuchlichen Antihistaminika im Blut von Ratten, die oral toxische Dosen erhalten hatten.

Ein Gemisch von Hi-Eff 8BP und SE52 verwenden RADER (111) und SCHIRMER u. PIERSON (116) zur Analyse von Methapyrilen und Mepyramin.

MAC DONALD u. PFLAUM (85) haben 1964 das gaschromatographische Verhalten von 16 Antihistaminika auf den Phasen SE30, Carbowax 20, Phenyl-diäthanolaminsuccinat (PDEAS) und XF-1150 (Nitrilsilikonpolymer) untersucht. Die besten Ergebnisse in Bezug auf Trennung und Peaksymmetrie erzielten sie mit einer 0,08 % PDEAS Säule auf 120/170 mesh Glasperlen.

KAZYAK u. KNOBLOCK (75) empfehlen für den Nachweis von sauren und basischen Substanzen die universell einsetzbare Silikongummiphase SE30.

Sie benutzen neun verschiedene Säulentemperaturen zwischen 115⁰ und 250⁰ C und geben die Retentionszeiten für 59 Stoffe, darunter 10 Antihistaminika an. Die Trennung von Substanzen mit gleicher Retentionszeit soll auf einer Säule mit 3 % QF1 (Fluorsilikonöl) vorgenommen werden.

Auch von FINKLE, CHERRY u. TAYLOR (46) und CLARKE (31) werden für SE30 die Retentionszeiten einer Vielzahl von Stoffen mitgeteilt.

Statt des wenig polaren SE30 empfiehlt ALBER (2) das Phenylmethylsilikonöl OV17 als universell einsetzbare stationäre Phase, die er zum Nachweis von so unterschiedlichen Stoffklassen wie Alkoholen und Sulfonamiden verwendet. Auch Antihistaminika lassen sich ohne störendes Tailing trennen. Noch polarer ist das von DRACH u. HOWELL (42) und CLARKE (31) benutzte Nitrilsilikonpolymer XE60.

BECKETT u. MOFFAT (11) und STEELE, BOLAN u. EYOLFSON (126) haben zur Ergänzung ihrer Systeme, die zur Identifizierung von Dopingmitteln dienen sollen, auch die Retentionszeiten von Antihistaminika mitgeteilt.

BECKETT u. Mit. (11) verwenden Säulen mit 2,5 % SE30 bei 210⁰ C und 2 % Carbowax 20m + 5 % KOH bei 140⁰ C. Durch Anwendung eines Temperaturprogramms bei einer Apiezon L/KOH Säule gelingt es STEELE u. Mit. (126), die Untersuchung auf Stimulantien, Antihistaminika, und Lokalanaesthe-

tika in 35 Minuten durchzuführen.

Carbowax 20m/KOH verwenden LUDERS, WILLIAMS, FRIED, REHM u. TISHLER (83) bei der Bestimmung von Tripelennamin in Milch und ALBERT u. WINDHEUSER (3) bei dem Nachweis von Chlorphenamin und seinen Metaboliten im Urin.

Bei der gaschromatographischen Bestimmung von Chlorphenamin in Plasma setzen TOWNLEY, PEREZ u. KABASAKALIAN (128) eine ähnliche Phase, Ucon Öl 50-HB-5100 (Polyäthylenglykoläther), auf mit KOH behandelten Glasperlen ein. Nach den Angaben der Autoren führt die Verwendung einer 6 ft Glasperlensäule anstelle einer 2,5 ft Kieselgursäule bei gleicher Retentionszeit zur sechsfachen Peakhöhe.

In der 1974 erschienenen umfangreichen Arbeit über die richtige Säulwahl bei der Identifizierung basischer Substanzen haben MOFFAT, STEAD und SMALLDON (92) das Verhalten von 62 Stoffen auf SE30, Apiezon L, OV17, Carbowax, Carbowax/KOH, CDMS(Hi-Eff 8BP), DEGS(Diäthylenglykolsuccinat) und DEGS/KOH untersucht. Unter diesen waren 14 Antihistaminika. Die Autoren empfehlen SE30 oder OV17, da man mit diesen Phasen die höchste Anzahl von Stoffen unterscheiden kann.

2.2.8.1. Derivatbildung

Die Derivatbildung ist bei der gaschromatographischen Bestimmung von Antihistaminika ungebräuchlich, da es sich um tertiäre Amine handelt. BRUCE, PITTS u. PINCHBECK (20) beschreiben die Spaltung von Pheniramin, Brompheniramin und Chlorphenamin mit alkalischer Kaliumpermanganatlösung zum entsprechenden Phenyl-2-Pyridyl-Keton, das sich mit einem Elektroneneinfangdetektor gut nachweisen läßt.

2.2.9. Verschiedene Nachweismethoden

Einige Bestimmungsmethoden lassen sich nur bei bekannter Zusammensetzung anwenden. Dazu gehören die von PFANDL (108), RINK u. RIEMHOFFER (115), YALCINDAG u. ONUR (145) angewandte wasserfreie Titration, die Acidimetrie (54, 59), die Fällung mit Silicowolframsäure und die anschließende gewichtsanalytische und polarimetrische Bestimmung (15) und die konduktimetrische Titration mit Pikrinsäure (98).

Die Leistungsfähigkeit der Hochspannungselektrophorese haben REISCH, ALFES u. MÖLLMANN (112) am Beispiel von Phenyläthylaminderivaten und anderen Arzneimitteln wie z.B. dem Antihistaminikum Bamipin untersucht. Dabei erwies sich die Trennleistung als nicht ausreichend.

2.3. Stoffwechsel der Antihistaminika

Die Pharmakokinetik und der Metabolismus der Antihistaminika ist ungenügend geklärt.

Nur für 15 von den 28 in dieser Arbeit berücksichtigten Stoffe finden sich Angaben über das Verhalten im Organismus, die zum Teil bei nicht therapeutischer Dosierung mit unspezifischen Verfahren gewonnen wurden.

Bei den Versuchen von BENSTZ (13, 14) wies Hundegalle nach Injektion von Antazolin eine deutliche Antihistaminaktivität auf. Die in 24 Stunden ausgeschiedene Menge betrug 0,26 %.

KABASAKALIAN, TAGGART u. TOWNLEY (70) geben an, daß nach oraler Gabe einer therapeutischen Dosis von Brompheniramin beim Menschen 5,3 % in 24 Stunden unverändert ausgeschieden werden. Die Ausscheidungsquote der beiden Metaboliten, N-Desmonomethylbrompheniramin und N-Desdimethylbrompheniramin, soll mit 6,3 % und 5,8 % etwa gleich sein.

Nach Untersuchungen von BRUCE, TURNBULL, NEWMANN u. PITTS (21) tritt neben diesen Hauptmetaboliten beim Menschen die durch oxydativen Abbau der Seitenkette entstandene β -(p-bromphenyl)-2-pyridinpropionsäure auf, die auch als Glycinkonjugat vorliegen kann. Das N-Oxyd des Brompheniramins kommt beim Menschen nicht vor. PERSSON und EKMAN (107) haben die Antihistaminikaaktivität im Serum nach Einnahme von einfachen und Retardtabletten mit Brompheniramin untersucht.

Die Angabe von BENSTZ (13, 14), daß von Chloropyramin beim Hund in der 24-Stundengalle 0,41 % und im 24-Stundenurin 2 % der injizierten Menge ausgeschieden werden, stützen sich ebenfalls auf Versuche mit der biologischen Methode nach MAGNUS. CUYPERS (36) hat bei seinen Untersuchungen zum Nachweis von Synpen^R (Chloropyramin) im menschlichen Harn festgestellt, daß eine fragliche unveränderte Substanz zwischen 0,4 und 1,6 % ausgeschieden wird. Der Ausscheidungsgipfel liegt zwischen 3. und 6. Stunde. Außerdem konnte er zwei Metaboliten nachweisen.

Das Hauptabbauprodukt von Chlorcyclizin ist nach den Untersuchungen von KUNTZMANN, KLUTCH, TSAI u. BURNS (79) mit Ratten, Kaninchen und Hunden Norchlorcyclizin, das eine sehr geringe Antihistaminaktivität hat. Chlorcyclizin und sein Demethylierungsprodukt lassen sich in allen Geweben der Ratten nachweisen. Die höchsten Konzentrationen fanden sich in Lunge, Niere, Milz und Leber. Nach POSNER, GRAVES, KING u. WILK (110) kommen Chlorcyclizin und Norchlorcyclizin auch im Rattenfoetus vor. BURNS u. PHILLIPS (23) fanden als weiteren Metaboliten bei Mensch und Ratte das N-Oxyd.

Von Clemastin werden nach Bestimmungen von HEIDER u. SCHWARZ (66) und AELLIG, KALBERER u. NÜSCH (1) mit Tritiummarkierter Substanz in 120 Stunden 44,6 % bzw. 55,9 % der zugeführten Radioaktivität mit dem Urin ausgeschieden.

Mit einer spektrophotometrischen Methode maßen CAVALLITO, CHAFETZ u. MILLER (25) die 24 Stunden Ausscheidung von Chlorphenamin beim Menschen. Sie erhielten Werte zwischen 12,5 und 57 % der eingenommenen Menge von 10,2 mg. BECKETT u. WILKINSON (12) verwandten eine spezifische gaschromatographische Methode und gaben an, daß 4 - 11 % der oralen Dosis von 10 mg Chlorphenaminbase im 24 Stunden Urin ausgeschieden werden. Wurde der Harn sauer eingestellt, stieg der Wert auf 20 - 26 %. Dagegen sank er bei alkalischem Urin auf 0,3 - 0,4 %. Diese Abhängigkeit der Ausscheidung vom Urin-pH ist bei den Amphetaminen ausgiebig untersucht worden. Man führt sie auf die tubuläre Rückresorption des nicht ionogenen Anteils zurück. Die Konzentration der nichtionisierten Base in den Tubuli der Niere läßt sich durch einen Wechsel des pH der Tubulärflüssigkeit und durch Änderung des Flüssigkeitsvolumens beeinflussen. Den Einfluß beider Faktoren konnten BECKETT u. Mit. (12) für Chlorphenamin nachweisen. KABASAKALIAN, TAGGART u. TOWNLEY (70) untersuchten gaschromatographisch und massenspektrometrisch die Ausscheidungsprodukte von Chlorphenamin. Sie fanden, daß bei chronischer Zufuhr beim Menschen 12,6 % unverändert, 13,2 % als N-Desmonomethylchlorphenamin und 5,8 % als N-Desdimethylchlorphenamin ausgeschieden werden. LANGE, THEODORE u. PRUYN (81) geben an, daß etwa 17 % des oral zugeführten Chlorphenamins innerhalb von 6h unverändert ausgeschieden werden. Die Bestimmung erfolgte durch Dünnschichtchromatographie und Fluorimetrie. KAMM, FIRULIO, MILLER u. VAN LOON (72) untersuchten den Metabolis-

mus von radioaktivmarkiertem Chlorphenamin bei Ratte und Hund. Sie fanden die höchsten Gewebsspiegel bei der Ratte in Leber, Lunge und Niere. Die Ausscheidung in 24 Stunden betrug bei der Ratte 0,9 % unveränderte Substanz, 2,8 % Monodesmethylchlorphenamin und 21,1 % Didesmethylchlorphenamin. Die entsprechenden Werte beim Hund waren 2,7 %, 2,6 % und 8,6 %. FISCHER, EULENHÖFER u. KRAFT (47) bestimmten Chlorphenamin im Serum mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Nach Einnahme von 8 mg Chlorphenamin in einer Retardform wurde das Maximum des Serumspiegels nach ca. 4 Stunden mit 2,4 µg/ml erreicht. PEETS, JACKSON u. SYNCHOWICZ (104) benutzten zur Untersuchung des Metabolismus beim Menschen Tritiummarkiertes Chlorphenamin und fanden nach oraler Gabe von 12 mg ca. 19 % der zugeführten Radioaktivität im 24 Stundenharn. Unpolare Metaboliten enthielten ca. 6 % der Dosis. Mit Hilfe der Radiochromatographie konnten 1,9 % Chlorphenamin, 1,2 % Monodesmethylchlorphenamin und 0,55 % Didesmethylchlorphenamin nachgewiesen werden.

In einem hausinternen Bericht der FIRMA ZYMA-BLAES (147) ist die Bestimmung des Blutspiegels von Dimetinden beschrieben. Kaninchen erhielten per os oder intravenös eine Menge von 2,5 mg/kg. Die höchsten, nach 1 bzw. 1/2 Stunde festgestellten Blutspiegel betrugen 0,1 und 0,37 µg/ml. Die Ausscheidung von Diphenhydramin im Urin von Kaninchen und Menschen wurde von HALD (62) mit einer kolorimetrischen Pikrinsäuremethode untersucht. Er stellte fest, daß beim Kaninchen bis zu 37 % unverändert ausgeschieden werden, dagegen beim Menschen 2 % und 3,6 %. Dagegen berichteten Mc GAVACK, DREKTER, SCHUTZER u. HEISLER (89), daß nach oraler Gabe von hohen Dosen in 24 Stunden 46 % unverändert ausgeschieden werden. Die Bestimmung erfolgte kolorimetrisch mit der Methylorangemethode nach BRODIE (19). GLAZKO u. DILL (52) identifizierten unverändertes Diphenhydramin im Urin des Menschen durch Extraktion, Gegenstromverteilung und UV-Absorption. Die gleichen Autoren (53) führten auch mit einer kolorimetrischen und einer radiochemischen Methode Verteilungsuntersuchungen an Ratten und Meerschweinchen durch. Die höchsten Konzentrationen bei der Ratte fanden sie bei oraler Gabe in der Leber und in der Milz, bei parenteraler in der Lunge und der Milz. Dagegen waren beim Meerschweinchen unabhängig von der Applikationsart die höchsten Werte in der Lunge und der Milz. Die Ausscheidung von mit der chemischen Methode bestimmbarer Produkte betrug bei der Ratte 4 - 6 % des zugeführten

Diphenhydramins. Die Ausscheidungsprodukte dieses Antihistaminikums im Urin des Rhesusaffen haben DRACH u. HOWELL (42) aufgeklärt. Sie identifizierten sie als N-Monodesmethyldiphenhydramin, N-Didesmethyldiphenhydramin, Diphenhydramin-N-oxid, Diphenylmethoxyessigsäure und das Glutaminkonjugat dieser Säure. Diphenhydramin selbst wird in einer Menge von 4 - 6 % ausgeschieden. Die Identifizierung erfolgte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie, Gaschromatographie, Ionenaustauschchromatographie und Infrarotspektrophotometrie an Hand von Vergleichssubstanzen. Den Metabolismus von Doxylamin untersuchten SNYDER, KLAHM u. WERNER (123) nach einer kolorimetrischen Pikrinsäuremethode bei Ratten und Hunden. Die Ausscheidung nach einmaliger Gabe lag zwischen 7 % und 21 % bei männlichen und zwischen 17 % und 36 % bei weiblichen Ratten. Bei chronischer Zufuhr schieden Hunde etwa 17 - 18 % der täglich zugeführten Menge Doxylamins aus, unabhängig vom Geschlecht.

Meclozin wird nach Untersuchungen von NARROD, WILK und KING (96) an der Ratte zu Norchlorcyclizin metabolisiert, das in allen Geweben und im Foetus von trächtigen Ratten nachgewiesen werden konnte. Meclozin fand sich nur in den ersten Giftwegen und in den Faeces. Im Urin wurde nach Gabe von Meclozin Norchlorcyclizin neben Spuren des Ausgangsverbindungs ausgeschieden.

Die Angaben der Literatur über die Verteilung von Mepyramin im Organismus stützen sich auf die anlässlich mehrerer tödlicher Vergiftungen von Kleinkindern erhobenen Befunde. Zur quantitativen Bestimmung in Organen und Körperflüssigkeiten benutzte MACHATA (87) eine UV-spektrophotometrische Methode. JOCHUM, PATSCHEIDER u. SCHEIBL (69) und LEMBECK, LIPP u. MARESCH (82) wiesen Mepyramin auf Grund der Hemmung der Histaminkontraktion nach. Die letzten Autoren geben einen Überblick über die in der Literatur vorliegenden Werte des Mepyramingehaltes im menschlichen Gewebe. Sehr hohe Konzentrationen finden sich stets in der Leber und in der Niere.

Für Methapyrilen findet sich bei CLARKE (31) die Angabe, daß nach oraler Zufuhr beim Menschen 10 % ausgeschieden werden und die Hauptausscheidung zwischen 1 1/2 und 4 1/2 Stunden liegt.

Phenindamin wird nach oraler Gabe von 25 mg beim Menschen zu einem geringen Teil unverändert ausgeschieden, wie COCHIN u. DALY (32) nach dünnschichtchromatographischer Untersuchung feststellten. Der Hauptmeta-

belit schien auf Grund von Farbreaktionen ein Phenol zu sein. Bei dem zweiten Metaboliten kann es sich um die demethylierte Verbindung handeln. Nach DAILEY, WAY, PARIKH, SONG u. HOWIE (37) werden beim Menschen nach oraler Gabe von 50 mg Phenindamin in 24 Stunden 2 % unverändert ausgeschieden.

Die Menge von Pheniramin und seinen Demethylierungsprodukten im Urin des Menschen bestimmten KABASAKALIAN, TAGGART u. TOWNLEY (70) nach chronischer Gabe von 37 mg Pheniraminmaleat. Es wurden 24,3 % unverändert ausgeschieden, 26,1 % als N-Monodesmethylpheniramin und 0,5 % N-Didesmethylpheniramin. Bei einmaliger Gabe von 74 mg Pheniraminmaleat wird mit 22,6 % etwa gleichviel ausgeschieden. Nach einer Pheniraminintoxikation bei einem Kleinkind bestimmten DIEKMANN, HÖSE-MANN u. DIBBERN (39) die Konzentrationen im Harn, Serum und Stuhl. Mc GAVAK, DREKTER, SCHUTZER u. HEISLER (89) stellten nach oraler Gabe von sehr hohen Dosen von Tripeleennamin mit der Methylorangemethode nach BRODIE fest, daß in 24 Stunden zwischen 15,8 % und 22,5 % der zugeführten Menge ausgeschieden werden. PERLMAN (106) gibt an, daß 10 % der eingenommenen Menge als Konjugat ausgeschieden werden, das mit Alkali zu Tripeleennamin gespalten werden kann. WAY u. DAILEY (136) fanden dagegen nach oraler Gabe von 50 - 100 mg Tripeleennamin nur Ausscheidungsquoten von weniger als 1 % in 24 Stunden. WEINMAN u. GEISSMAN (137) untersuchten mit C¹⁴ markiertem Tripeleennamin die Verteilung, Ausscheidung und den Metabolismus beim Meerschweinchen. Sie fanden, daß 90 % der Gesamtradioaktivität mit dem Urin ausgeschieden werden. Metaboliten traten auch in der Galle auf. Weniger als 10 % der Radioaktivität waren mit Chloroform extrahierbar. Tripeleennamin war in dieser Fraktion nicht nachweisbar. Etwa 2/3 der Radioaktivität lag in Form mit β -Glucuronidase spaltbaren Konjugaten vor. Auch unter den Hydrolyseprodukten befand sich kein Tripeleennamin. Die Autoren vermuteten als Hauptweg des Metabolismus eine Hydroxylierung in einer oder in mehreren Positionen. HARDMEIER u. SCHMIDLIN-MESZAROS (63) bestimmten Tripeleennamin nach einer tödlichen Vergiftung in Körperflüssigkeit und Geweben. Sie fanden die höchsten Gewebespiegel in der Leber, Galle und Niere. CHAMBON u. CHAMBON-MOUGENOT (28) konnten nach oraler Gabe von 65 mg Tripeleennaminchlorid bei Meerschweinchen nur Spuren der Ausgangsverbindung im Urin nachweisen. Im 24 Stunden Urin wurde Tripeleennamin-N-oxid in

einer Menge, die 0,55 % der eingenommenen Dosis entsprach, festgestellt.

2.4. Ergebnis der Literaturübersicht

In der Literatur finden sich nur für wenige Antihistaminika ausreichende Angaben, sowohl auf dem Gebiet der Analytik als auch auf dem des Verhaltens im Organismus. Für einige Stoffe fehlen jegliche Angaben. Nur für etwa die Hälfte der hier betrachteten Antihistaminika wurden Stoffwechseluntersuchungen durchgeführt, deren Methoden jedoch zum größten Teil den heutigen Spezifitätsforderungen nicht standhalten. Von den beschriebenen Verfahren zur Extraktion und zum Nachweis ist nur in sehr wenigen Fällen bewiesen, daß sie sich dazu eignen, die bei therapeutischer Dosierung vorkommenden Konzentrationen spezifisch nachzuweisen.

Von den veröffentlichten Methoden wurde der überwiegende Teil nur an Reinsubstanzen erprobt. Für den Nachweis im biologischen Material werden besonders hohe Anforderungen an Empfindlichkeit und Spezifität gestellt. Die üblichen Konzentrationen eines Antihistaminikums im Harn liegen während der ersten 24 Stunden nach Einnahme einer therapeutischen Dosis im ppm und ppb Bereich. Diese geringen Mengen beschränken die Anwendung von Fällungs- und Farbreaktionen, der Infrarotspektrophotometrie und der Papierchromatographie auf Vergiftungsfälle mit hoher Überdosierung. Ein Nachweis einer therapeutischen Dosierung mittels Dünnschichtchromatographie ist nur bei wenigen Antihistaminika gelungen. Die Empfindlichkeit der üblichen Anfärbereagenzien reicht bei dem in der Regel geringen Prozentsatz an unveränderter Substanz nicht aus. Die optischen Methoden (Kolorimetrie, UV-Spektrophotometrie und Spektrofluorimetrie) sind hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit häufig brauchbar, jedoch sind sie wegen der geringen Spezifität sehr störanfällig. Neben körpereigenen Substanzen aus dem Urin erfaßt man auch andere Arzneimittel mit gleichen oder ähnlichen funktionellen Gruppen. Zwischen Metaboliten und unveränderter Substanz kann man meistens nicht unterscheiden. Ausreichende Empfindlichkeit und Spezifität bieten nur gaschromatographische und die mit einem Trennverfahren verbundenen radiochemischen Methoden. Die letzte Methode ist nur bei Stoffwechseluntersuchungen einsetzbar. Wegen der Notwendigkeit radiomarkierter Substanz und der Strahlenbelastung ist sie nur bedingt brauchbar.

Die Gaschromatographie wurde erst in wenigen Fällen zum Nachweis von Antihistaminika nach therapeutischer Dosierung im Urin angewandt.

Antihistaminika sind nur selten Anlaß tödlicher Vergiftungen. Dagegen kann es bei Einnahme von Antihistaminika, die als Bestandteil von Grippe- und Schnupfenmitteln viel verwendet werden, zur Beeinträchtigung des Fahrvermögens kommen. Angaben über die Einnahme derartiger Mittel sind aber nur selten sicher zu bestätigen, da ausreichende Untersuchungen über den Nachweis von Antihistaminika fehlen. Es war deshalb nötig, die analytischen Daten der in Deutschland gebräuchlichen Antihistaminika festzustellen und eine Aufarbeitungsmethode zu entwickeln, die die Isolierung der geringen Arzneistoffmengen von den körpereigenen Substanzen gestattet.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

In dieser Arbeit sollten Nachweismethoden für Antihistaminika mit den modernen analytischen Verfahren der Infrarot- und Ultraviolett-spektrophotometrie, der Dünnschicht- und Gaschromatographie erarbeitet werden. Mit Hilfe des empfindlichsten Verfahrens, der Gaschromatographie, sollte versucht werden, die Antihistaminika nach therapeutischer Dosierung im Urin nachzuweisen. Dabei war die Abtrennung der geringen Arzneimittelspuren von den physiologisch vorkommenden Harnbestandteilen besonders zu berücksichtigen.

Die Untersuchungen wurden an 28 in der Bundesrepublik Deutschland gebräuchlichen Antihistaminika durchgeführt. Von diesen waren 27 in einer oralen Darreichungsform im Handel. Hibernon^(R) (Bromopyramin) stand nur als Salbe und Creme zur Verfügung. Auch für diese Substanz wurden die analytischen Daten bestimmt, da es bei lokaler Anwendung zur percutanen Resorption kommt. Es sind mehrere Fälle bekannt, in denen nach dem Gebrauch einer Antihistaminikum-Salbe bei Kindern Vergiftungserscheinungen auftraten (93, 80, 119, 121).

In dieser Aufstellung sind Phenothiazinderivate nicht miteinfaßt. Beim Einsatz der Phenothiazine steht die psychosedative Wirkung im Vordergrund. Daher werden sie jetzt allgemein zu den Psychopharmaka gerechnet.

3.1. Extraktion aus wässrigen Lösungen

Nach den Angaben der Literatur (AUTERHOFF, 6) sind Antihistaminika aus basischem Milieu mit lipophilen Lösungsmitteln extrahierbar. Zur Überprüfung wurden zunächst wässrige Lösungen von Arzneimittelspezialitäten, später von Reinsubstanzen ausgeschüttelt. Der im Anhang beschriebene Arbeitsgang I entspricht einem abgekürzten Stas-Otto Verfahren, wie es auch zur routinemäßigen Untersuchung von Harnproben auf Arzneimittel gebräuchlich ist.

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Tab. 1 Gravimetrische Ausbeuten der Ätherextraktion

Substanz	Arzneispezialität	a %	b %
Adeptolon ^R			89
Antazolin	Antistin Tabletten	97	96
Bamipin	Soventol Ampullen	109	95
Bromazin	Ambrodyl Kapseln	108	92
Bromopyramin			96
Brompheniramin	Ilvin Dupletten	86	99
Carbinoxamin			100
Chlorocyclizin			93
Chloropyramin	Synpen Dragees	91	105
Chlorphenoxamin	Systral Dragees	128	98
Clemastin	Tavegil Tabletten	97	96
Cyproheptadin			89
Dexchlorpheniramin			99
Dimetinden	Fenistil Dragees	89	97
Diphenhydramin	Dabylen Ampullen	93	96
Diphenylpyralin	Kolton Tabletten	92	96
Doxylamin			95
Histapyrrodin	Luvistin Tabletten	94	95
Isothipendyl	Andantol forte Dragees	106	99
Mebhydrolin	Omeril Dragees	100	100
Meclozin ^x	Bonamine Tabletten	94	78
Mepyramin	Neo Bridal Dragees	90	-
Methapyrilen			97
Phenindamin	Thephorin Dragees	123	100
Pheniramin	Aviletten Tabletten	104	96
Pyrrobutamin			75
Thenalidin	Sandosten Dragees	106	93
Tripelennamin	Pyribenzamin Tabletten	83	105

x Anfall in der sauren Ätherextraktion

a = Ausbeute nach Extraktion von Zubereitungen

b = Ausbeute nach Extraktion von Reinsubstanzen

Bei der an 28 Antihistaminika durchgeführten Untersuchung ergab sich, daß sie aus natronalkalischem Milieu mit Äther praktisch vollständig ausschüttelbar sind. Wenn allerdings zunächst eine Extraktion aus saurer Lösung vorgenommen wird, fällt Meclozin schon im sauren Extrakt an. Dies läßt sich durch die gute Löslichkeit der mineralisauren Salze von Meclozin in Äther und Chloroform erklären. In Wasser sind die Salze schwer löslich.

Die aus Zubereitungen und aus Reinsubstanzen ermittelten Werte stimmen im allgemeinen gut überein. Bei einigen Arzneistoffzubereitungen dürften die unbekannten Hilfsstoffe das Ergebnis beeinflußt haben. Da die gravimetrische Bestimmung wenig spezifisch ist, wurde die Arbeit für einige Beispiele an Reinsubstanzen durch anschließende spektrophotometrische Bestimmung überprüft. (II)

Tab. 2 Vergleichsbestimmungen der Extraktionsrate

	gravimetrisch %	UV-spektrophotometrisch %
Bromazin	97	96
Diphenhydramin	103	99
Isothipendyl	99	90
Meclozin	96	76

Die Übereinstimmung zwischen den beiden Methoden ist gut. Damit konnte die gute Extrahierbarkeit nach der unter I angegebenen Methode sicher festgestellt werden.

3.2. Ultraviolettspektrophotometrie

Die Ergebnisse der UV-Spektrophotometrie sind für sich allein als Identifizierung nicht beweisend, doch zusammen mit anderen, vor allem chromatographischen Methoden, gestatten sie die Gleichartigkeit von Verbindungen zu erkennen. UV-Spektren können mit weniger Substanz und geringerem Aufwand als IR-Spektren erhalten werden. Gleichzeitig gestatten sie, wenn die spezifische Extinktion bekannt oder Reinsubstanz vorhanden ist, eine einfache quantitative Bestimmung. Zur Ergänzung der Literatur wurden von

28 Antihistaminika die Spektren der handelsüblichen Salze in wässriger Lösung mit dem registrierenden Spektralphotometer RPQ20A der Firma Zeiss, Oberkochen aufgenommen. Zur quantitativen Bestimmung wurden für geeignete Maxima die spezifische Absorption ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$) bestimmt (III). Die an wässrigen Lösungen der Salze ermittelten Werte sind auf den Gehalt an freier Base umgerechnet. Aus den in Tabelle 3 aufgeführten Ergebnissen ist zu erkennen, daß bis auf einige Antihistaminika die spezifischen Absorptionen hoch sind. Nur bei wenigen ist eine empfindliche quantitative Bestimmung mit der UV-Spektrophotometrie nicht möglich, da die spezifischen Extinktionen zu niedrig sind oder geeignete Maxima überhaupt fehlen.

Tab. 3 UV-Absorption von Antihistaminika

Substanz	Salz	Maxima in H ₂ O zwischen 220 u. 325 nm; E (1%, 1cm) in Klammer, für den Haupt- peak unterstrichen
Adeptolon	Maleat	<u>243</u> (495), 306
Antazolin	Hydrochlorid	<u>242</u> (571), 290
Bamipin	Hydrochlorid	<u>252</u> (430), 298
Bromazin	Hydrochlorid	<u>227</u> (429)
Bromopyramin	Hydrochlorid	<u>244</u> (430), 305
Brompheniramin	Maleat	255, <u>261</u> (192), 268
Carbinoxamin	Maleat	254, <u>261</u> (195), inflex. 269
Chlorcyclizin	Diphosphat	<u>230</u> (440), 259, 262, 277
Chloropyramin	Hydrochlorid	221, <u>244</u> (492), 305
Chlorphenoxamin	Hydrochlorid	<u>222</u> (447), 253, 258, 264, 275
Clemastin	Hydrogenfumarat	inflex. 253 u. 258 u. 265 u. 275
Cyproheptadin	Hydrochlorid	<u>223</u> , inflex. 240 (655), 284 (325)
Dexchlorpheniramin	Maleat	256, <u>261</u> (195), 268
Dimetinden	Maleat	<u>258</u> (540)
Diphenhydramin	Hydrochlorid	252, <u>258</u> (19), 264
Diphenylpyralin	Hydrochlorid	252, <u>258</u> (17), 264, 268
Doxylamin	Succinat	<u>260</u> (160), 266
Histapyrrocin	Hydrochlorid	<u>250</u> (449), 295
Isothipendyl	Hydrochlorid	<u>250</u> (826)
Mebhydrolin	Naphthalin 1,5 disulfonat	<u>226</u> , 275, 284 (415)
Meclozin	Hydrochlorid	<u>230</u> (336), 265, 272
Mepyramin	Maleat	<u>246</u> (585), 285, 306
Methapyrilen	Hydrochlorid	<u>241</u> (743), 304
Phenindamin	Tartrat	<u>258</u> (330)
Pheniramin	p-Aminosalicylat	<u>263</u> (748), 301
Pyrrobutamin	Diphosphat	<u>227</u> (452), inflex. 240, 276
Thenalidin	Tartrat	<u>245</u> (504), 293
Tripelennamin	Hydrochlorid	<u>246</u> (570), 305

3.3. Infrarotspektrophotometrie

Bei der Extraktion und Reinigung fallen die Antihistaminika als Basen an und können in dieser Form zur Infrarotspektroskopie benutzt werden. Eine Salzbildung durch Zusatz geringer Mengen Salzsäure vor dem Eindampfen, wie es von WOLF (141) für die Amphetamine empfohlen wurde, ist wegen der Säurelabilität einiger Antihistaminika hier nicht sinnvoll. Die Literaturspektren der Antihistaminika (31, 63) wurden überwiegend von den Basen aufgenommen. Für 16 der 28 Antihistaminika liegen keine Infrarotspektren der Basen vor. Es handelt sich um: Adeptolon^(R), Antazolin, Bromopyramin, Brompheniramin, Chlorphenoxamin, Clemastin, Dexchlorpheniramin, Dimetinden, Diphenhydramin, Diphenylpyralin, Histapyrroldin, Isothipendyl, Mebhydrolin, Methapyrilen, Pheniramin und Thenalidin. Die Basenspektren dieser Stoffe sind auf den Abbildungen 1 - 16 aufgeführt.

Die Herstellung der IR Spektren ist in Vorschrift IV beschrieben.

Von den verschiedenen Methoden (BRÜGEL, 22) zur Erleichterung der Identifizierung einer unbekannten Substanz durch Vergleich des Spektrums mit denen einer Spektrensammlung hat sich wegen ihrer Einfachheit die von CLARKE (31) angewandte Indexmethode bewährt. Hierbei werden aus einem Spektrum die drei stärksten Peaks herausgesucht und nach abnehmender Intensität mit A, B und C bezeichnet. Eine grobe Identifizierung findet dann durch Heraussuchen der Substanzen statt, deren Hauptpeaks bei den gleichen Wellenlängen auftreten. Zur Ergänzung sind in der Tabelle 4 die entsprechenden Daten für die 28 behandelten Antihistaminika aufgeführt. Die Angaben weichen zum Teil von den bei Clarke mitgeteilten ab, was auf Unterschiede im Gerät und in der Präparationstechnik zurückgeführt werden kann.

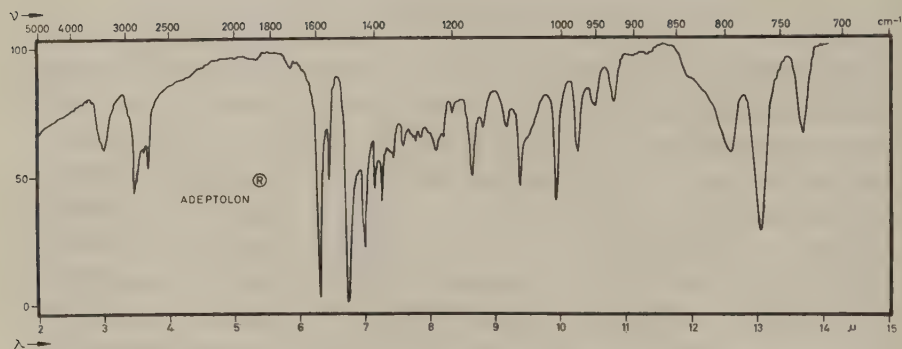


Abb. 1 IR-Spektrum (Methode IV) Adeptolon^R Base

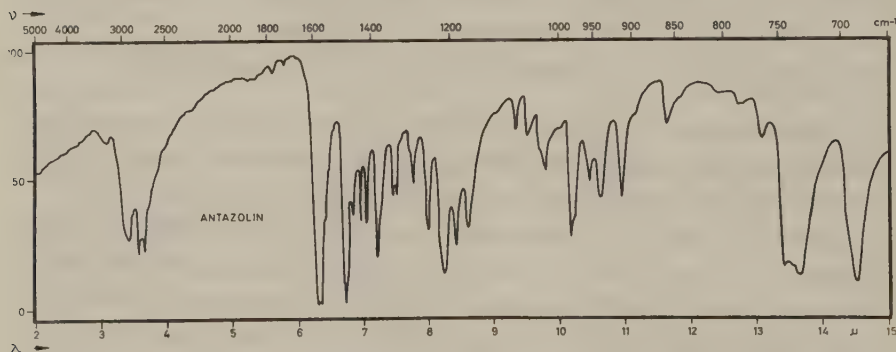


Abb. 2 IR-Spektrum (Methode IV) Antazolin Base

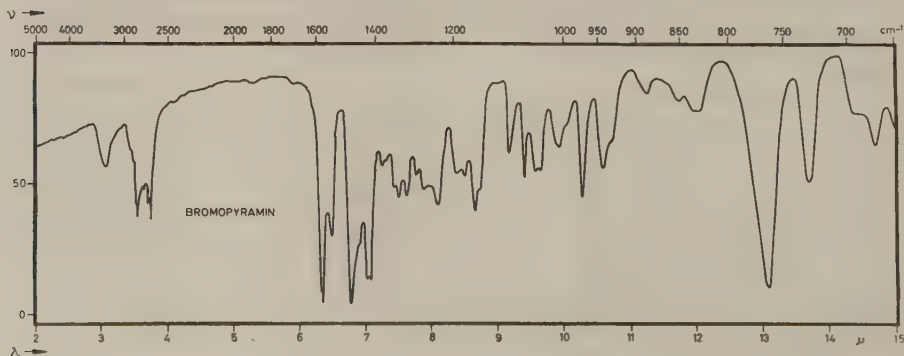


Abb. 3 IR-Spektrum (Methode IV) Bromopyramin Base

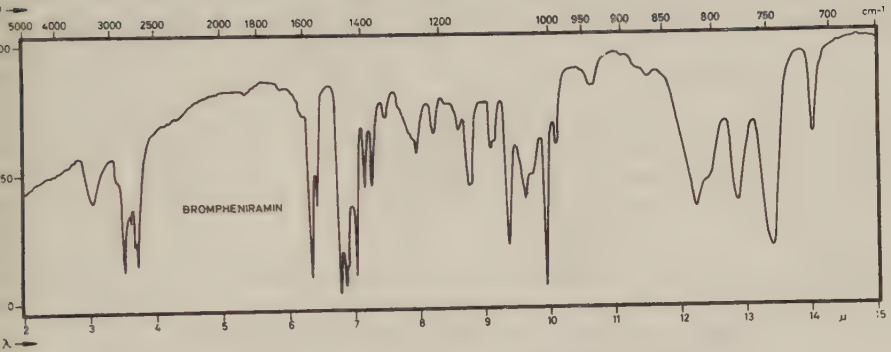


Abb. 4 IR-Spektrum Methode IV) Brompheniramin Base

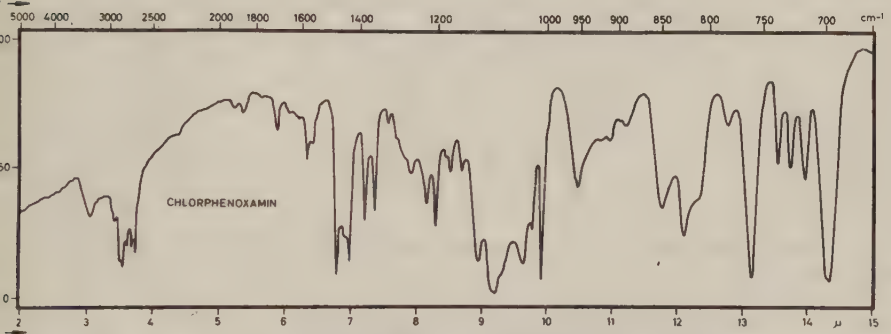


Abb. 5 IR-Spektrum (Methode IV) Chlorphenoxamin Base

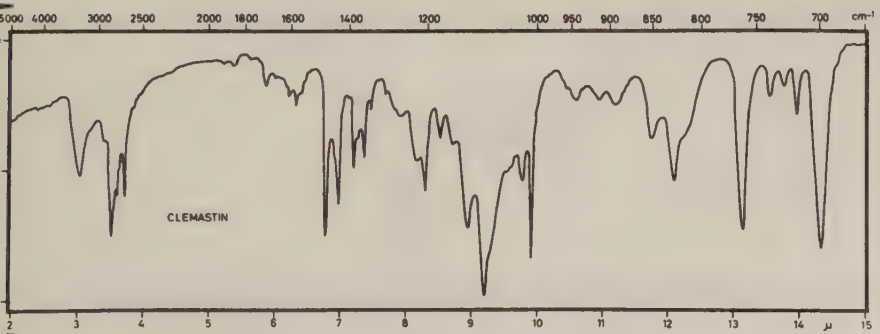


Abb. 6 IR-Spektrum (Methode IV) Clemastin Base

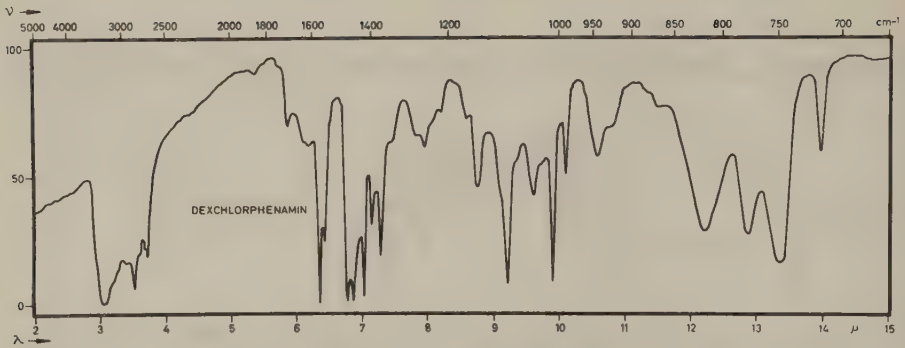


Abb. 7 IR-Spektrum (Methode IV) Dexchlorpheniramin Base

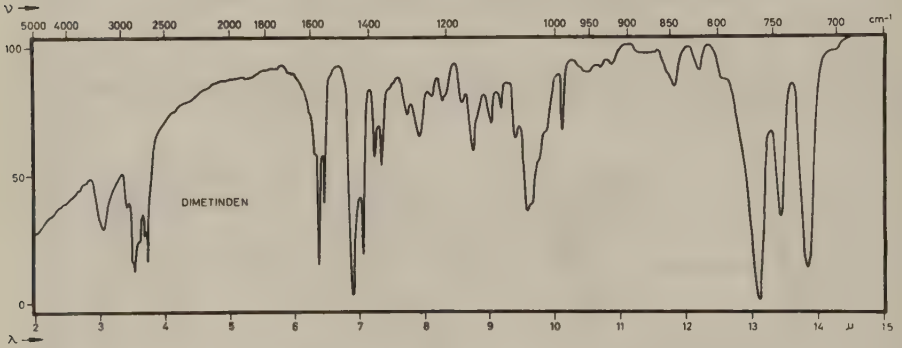


Abb. 8 IR-Spektrum (Methode IV) Dimetinden Base

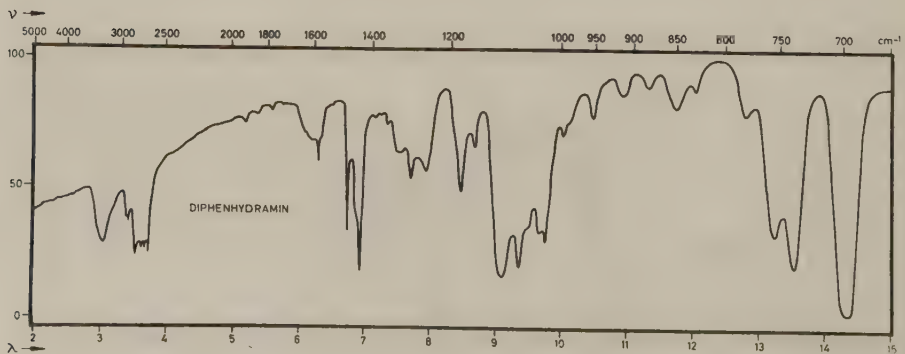


Abb. 9 IR-Spektrum (Methode IV) Diphenhydramin Base

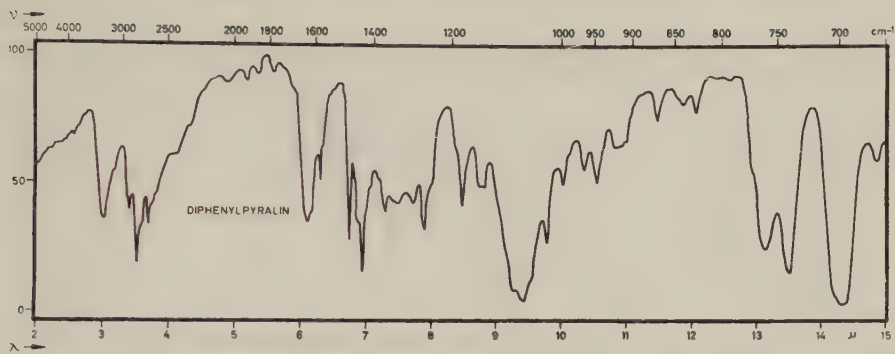


Abb. 10 IR-Spektrum (Methode IV) Diphenylpyralin Base

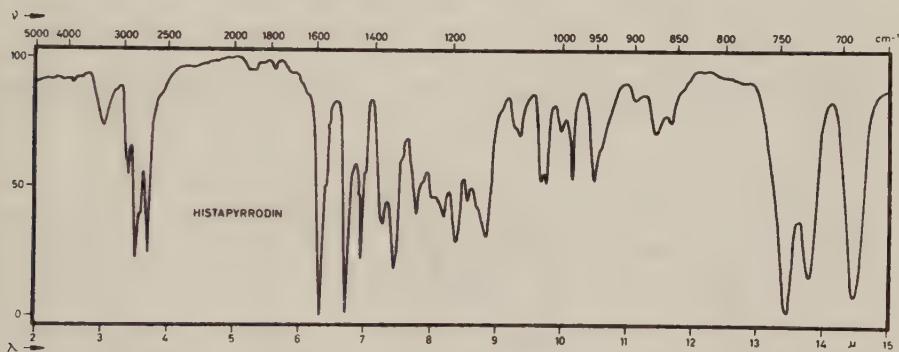


Abb. 11 IR-Spektrum (Methode IV) Histapyrrodin Base

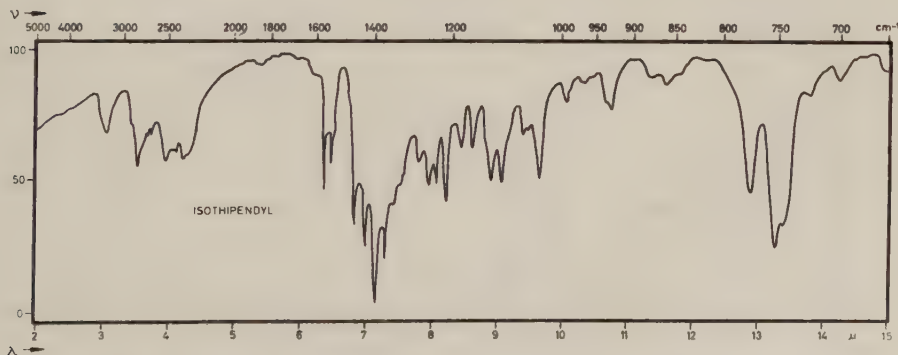


Abb. 12 IR-Spektrum (Methode IV) Isothipendyl Base

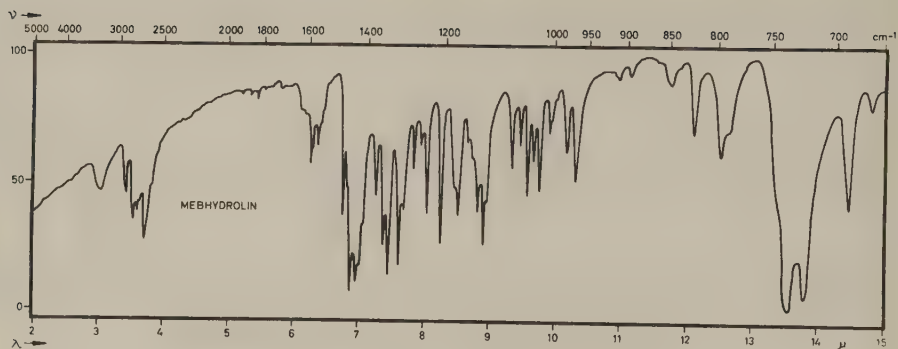


Abb. 13 IR-Spektrum (Methode IV) Mebhydrolin Base

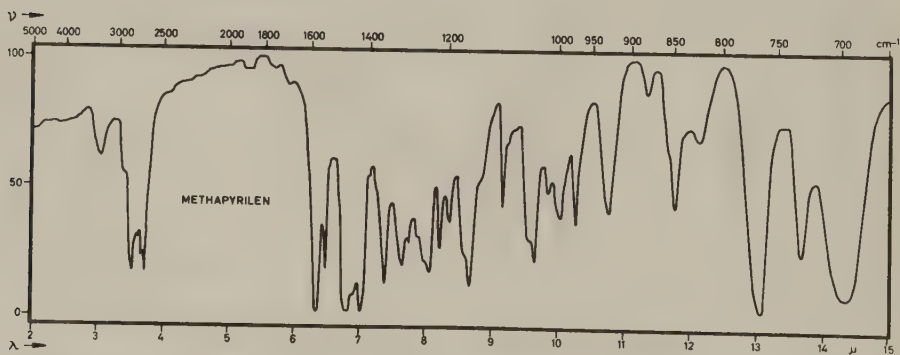


Abb. 14 IR-Spektrum (Methode IV) Methapyrilen Base

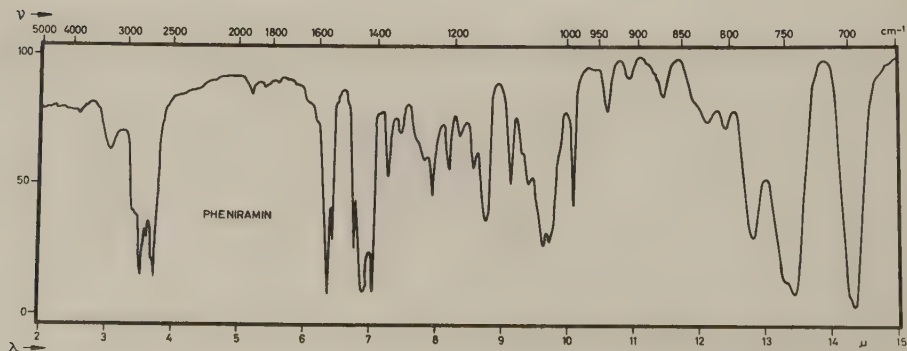


Abb. 15 IR-Spektrum (Methode IV) Pheniramin Base

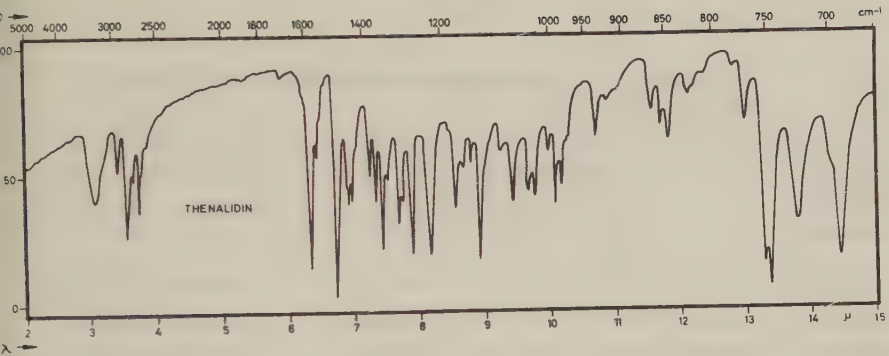


Abb. 16 IR-Spektrum (Methode IV) Thenalidin Base

Tab. 4 Infrarotindex der drei stärksten Peaks (cm^{-1}) in den Basenspektren von Antihistaminika

	A	B	C
Adeptolon	1482	1582	1430
Antazolin	1585 or 1575 or 1482	689	1213 or 733
Bamipin	747	1487 or 1236	1580 or 725 or 693
Bromazin	1066	1007	1473 or 1090
Bromopyramin	1575 or 1475	765	1415 or 1425
Brompheniramin	1470	1455 or 1007	1570 or 1420
Carbinoxamin	1082	1110	1570 or 1475 or 1455 or 1010
Chlorcyclizin	1004	1280	1135
Chloropyramin	1475	1580	1425
Chlorphenoxamin	1085	1475 or 1008	B 761 or 697
Clemastin	1085	1008	697
Cyproheptadin	799 or 748	767	1285 or 777
Dexchlorpheniramin	1572 or 1455	1475	1423
Dimetinden	1448 or 762	1570 or 722	1415
Diphenhydramin	698	1097	1450
Diphenylpyralin	1062 or 695	1080	1438 or 739
Doxylamin	697	1460 or 1125	B 1090 or 746
Histapyrrocin	1585 or 1490 or 743	691	1345 or 725
Isothipendyl	1399	1370	1430 or 753
Mebhydrolin	738	1455 or 724	1435
Meclozin	1470 or 1003	1128 or 1082 or 696	755
Mepyramin	1595 or 1515 or 1495	1250	1480
Methapyrilen	1575 or 1470 or 1425	765	696
Phenindamin	698	1445	753 (Base dunkel verfärbt)
Pheniramin	697	1592 or 1455	B: 1420 or 743
Pyrrobutamin	1475	693	1083 or 1010
Thenalidin	1488	747	1575 or 752
Tripelennamin	1480 or 1580	1428	767

3.4. Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden entsprechend der Standardmethode nach STAHL (125) durchgeführt. Die hierbei angewandten Bedingungen finden sich im Anhang unter V.

Fließmittel:

Zunächst wurden die Trenneigenschaften von 13 in der Literatur erwähnten Fließmittel geprüft, die entweder schon zur Dünnschichtchromatographie von Antihistaminika benutzt wurden oder allgemein verwendbar sein sollen.

Tab. 5 Geprüfte Fließmittel

Nr.	Mischung	Lit.
1	Methanol	(9)
2	Methanol:Methylal 50:50	(9)
3	Benzol:Dioxan:NH ₃ 60:35:5	(32)
4	Äthanol:Eisessig:Wasser 50:30:20	(32)
5	n-Butanol:Methanol 40:60	(32)
6	Cyclohexan:Benzol:Diäthylamin 75:15:10	(44)
7	Aceton:Diäthylamin:Methanol 90:10:10	(50)
8	n-Butanol:Eisessig:Wasser 60:15:15	(50)
9	Methanol:Acetatpuffer 4,6 30:70	(99)
10	0,1n NH ₃ in Methanol	(131)
11	Benzol:Dioxan:Aceton:NH ₃ 50:20:28:2	(132)
12	Chloroform:Cyclohexan:Diäthylamin 70:20:10	(133)
13	Cyclohexan:Chloroform:Diäthylamin 50:40:10	(133)

Von diesen Mischungen wurden die Systeme 2, 4, 5, 8, 10, 11 zur systematischen Prüfung ausgewählt. In der Tabelle 6 sind die gefundenen hRf-Werte von 27 Antihistaminika aufgeführt.

Das Fließmittel 3 entmischte sich beim Stehen. Durch Verwendung einer größeren Menge des mit Wasser und Benzol mischbaren Dioxan konnte eine stabile Mischung erreicht werden.

14 Benzol:Dioxan:NH₃ 35:60:5 eigene Mischung

Tab. 6 Gefundene hRf-Werte

Fließmittel - Nr.	2	4	5	8	10	11	14	15
Adeptolon	26	59	18	25	52	85	96	69
Antazolin	9	83	4	48	17	17	52	8
Bamipin	29	71	33	38	45	52	94	37
Bromazin	25	80	23	43	55	70	93	50
Bromopyramin	28	60	21	23	51	77	98	54
Brompheniramin	15	53	8	16	31	35	82	18
Carbinoxamin	10	49	4	14	37	25	83	19
Chlorcyclizin	43	83	45	43	63	72	96	47
Chloropyramin	22	58	18	21	47	59	96	45
Chlorphenoxamin	31	81	29	43	52	64	97	50
Clemastin	19	82	18	44	38	45	92	33
Cyproheptadin	34	82	37	43	53	70	97	37
Dexchlorpheniramin	13	54	9	18	33	23	77	17
Dimetinden	12	44	9	10	31	39	86	20
Diphenhydramin	29	79	23	38	53	70	97	44
Diphenylpyralin	19	78	18	42	39	41	79	25
Doxylamin	14	42	8	9	36	53	92	23
Histapyrrocin	43	84	51	48	63	92	99	75
Isothipendyl	23	63	19	30	48	64	92	44
Mebhydrocin	39	80	41	41	61	70	96	44
Meclozin	97	99	99	92	96	99	99	99
Methapyrilen	24	55	18	22	52	67	94	43
Phenindamin	40	85	34	42	70	69	99	49
Pheniramin	14	49	9	16	33	26	69	17
Pyrrobutamin	33	90	35	53	55	86	99	47
Thenalidin	28	70	30	37	46	51	93	36
Tripelennamin	27	54	20	20	47	59	94	39

Bei diesem Fließmittel zeigte sich, daß es die Substanzen im oberen Teil der Platte anhäufte. Durch Ersatz des polaren Ammoniaks durch das weniger polare Triäthylamin gelang es, eine gleichmäßige Verteilung zu erreichen.

15 Benzol:Dioxan:Triäthylamin 35:60:1 eigene Mischung

Eine gute Fleckform wird nur mit sauren oder basischen Fließmitteln gefunden. Organische Basen wie Diäthylamin sind selbst durch Erhitzen nur schwer aus der Schicht zu entfernen und stören die Nachweisreaktion nach Dragendorff erheblich. Daher ist das System 15, das gute Verteilung und Konstanz der hRf-Werte aufweist, nur bedingt brauchbar. Die beiden sauren Systeme 4, 8 und die ammoniakhaltigen Fließmittel 10, 11 erlauben dagegen eine gute Trennung der Antihistaminika ohne Einschränkung der Nachweisempfindlichkeit.

3.5. Gaschromatographie

Für die gaschromatographischen Untersuchungen diente das Gerät Pye 104 der Firma Philips, das mit einem erweiterten Detektoraufsatz ausgerüstet war. Auf diesem befinden sich Elektroneneinfang-, Flammenionisations- und Thermoionik-Detektor nebeneinander, und über einen Splitter ist der gleichzeitige Betrieb von zwei Detektoren möglich. Die Injektionstemperatur ist getrennt regelbar, und die Substanz wird direkt auf die Säule aufgegeben. Es wurden 5 ft Glassäulen mit 4 mm Innendurchmesser benutzt.

3.5.1. Arbeitsbedingungen

Bei den Versuchen zur gaschromatographischen Trennung von 28 Antihistaminika wurde der FID eingesetzt. Stickstoff diente als Trägergas. Die Einspritztemperatur betrug 240°C , die des Detektors 270°C . Die verwendeten stationären Phasen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Zusätzlich dazu wurde auch eine Füllung mit 2 % Carbowax 20 m auf Chromaton N-AW-DMCS 75-95 mesh geprüft. Die dabei erzielte Peakform war zufriedenstellend. Jedoch wurden auch bei der maximalen Betriebstemperatur von 200°C nur die leichter flüchtigen der Antihistaminika innerhalb von 30 min eluiert. Ein großer Teil der geprüften Substanzen war mit dieser Säule nicht erfassbar.

Tab. 7

stationäre Phase		Trägermaterial
1 %	SE30	Chromosorb AW-DMCS 80-100 mesh
1 %	SP1000	Supelcoport 100/120 mesh
1 %	Dexil 300	Supelcoport 100/120 mesh
3 %	SP2250	Supelcoport 100/120 mesh (Best.Nr. 01-1983 Supelco)
3 %	XE 60	Chromosorb WHP 100/120 mesh
3 %	OV 225	Gaschrom Q 100/120 mesh

Die in Tabelle 8 aufgeführten Retentionszeiten sind korrigiert. Die Gesamtretentionszeit von der Aufgabe der Substanz bis zum Maximum des Peaks ist um die Zeit verringert, die eine Substanz, die sich nicht in der stationären Phase aufhält, braucht, um durch die Apparatur zu gelangen. Als Bezugssubstanz für diese sogenannte Totzeit wird gewöhnlich Luft gewählt. Ist der Detektor jedoch unempfindlich gegenüber Luft, wie beim FID, kann bei hohen Temperaturen auch die Zeit zwischen der Substanzeingabe und der Lösungsmittelfront als Totzeit angesehen werden (31).

Die Arbeitsbedingungen wurden so gewählt, daß unabhängig von der Polarität und der Belegung des Säulenmaterials die geprüften Antihistaminika bis auf 2-3 Ausnahmen innerhalb von 10 Minuten eluiert wurden. Damit lagen die Retentionszeiten in der gleichen Größenordnung. Peakform und Auflösung auf den verschiedenen Phasen waren damit direkt vergleichbar, ohne den Einfluß unterschiedlicher Retentionszeiten berücksichtigen zu müssen.

Tab. 8 Erzielte Retentionszeiten (min) von Antihistaminika

Stationäre Phase Säulentem. (° C); Strömung (ml/min)	SE30	SE30	SP1000	Dexsil	SP2250	XE60	OV225
	200;50	230;50	230;40	210;60	228;60	190;63	200;63
Adepton	7,8		7,7	6,6	7,2	6,3	7,5
Antazolin	6,9	2,3	18,3	ca. 14	9,9	13,6	16,7
Bamipin	5,2	1,8	5,4	4,6	5,6	4,4	5,35
Bromazin	3,9	1,4	3,9	3,4	3,6	3,1	3,1
Bromopyramin	5,4	1,8	6,1	4,6	5,4	4,8	5,9
Brompheniramin	3,3	1,3	3,7	2,9	3,2	2,8	3,25
Carbinoxamin	2,9	0,95	3,6	2,6	3,0	2,7	3,0
Chlorcyclizin	5,3	1,9	4,9	4,5	4,6	3,8	4,5
Chlorpyramin	4,2	1,4	4,6	3,6	4,2	3,8	4,35
Chlorphenoxamin	3,0	1,0	2,6	3,6	2,7	2,2	2,4
Clemastin	9,3	3,2	6,9	7,9	8,2	6,0	7,1
Cyproheptadin	7,4	2,6	8,2	6,6	7,8	5,85	7,4
Dexchlorpheniramin	2,2	0,8	2,6	1,9	2,4	1,95	2,2
Dimetinden	6,2	2,2	6,2	5,0	5,8	4,9	6,2
Diphenhydramin	1,4	0,55	1,3	1,1	1,3	1,1	1,2
Diphenylpyralin	3,3	1,2	2,9	2,6	3,2	2,5	2,9
Doxylamin	1,8	0,65	1,6	1,7	1,6	1,2	1,5
Histapyrrodin	5,8	1,9	5,1	4,6	5,2	4,15	4,95
Isothipendyl	5,6	2,1	6,6	5,0	6,2	4,65	6,0
Mebhydrolin	10,1	3,4	20,1	10,9	13,0	13,7	17,4
Meclozin	-	16,6	ca. 1,5 h	-	ca. 46	-	-
Mepyramin	5,0	1,8	6,6	4,4	5,6	4,85	6,0
Methapyrilen	2,2	0,8	2,6	1,8	2,2	2,0	2,35
Phenindamin	3,8	1,4	4,7	3,3	4,3	3,3	2,95
Pheniramin	1,1	0,4	1,2	0,95	1,2	0,85	1,1
Pyrobutamin	9,8	3,0	9,0	8,5	8,6	7,2	8,5
Thenalidin	5,2	1,9	6,1	5,2	5,4	4,65	5,7
Tripeleennamin	2,6	1,1	2,3	1,7	2,1	1,8	2,1

3.5.2. Erzielte Trennungen

Zur gaschromatographischen Trennung sind alle sechs geprüften Phasen geeignet. Für SE 30 als der Phase mit der geringsten Polarität reichen eine Strömung von 50 ml und eine Temperatur von 200°C bereits aus, um bis auf Meclozin sämtliche Antihistaminika innerhalb von 10 min zu eluieren. Meclozin, das auch ein von den anderen Substanzen abweichendes dünn-schichtchromatographisches Verhalten zeigt, läßt sich bei 230°C auf SE 30 innerhalb von 20 min erfassen.

Dexil 300 besitzt ein ähnliches Verhalten wie wenig polare Silikonphasen. Sein Vorteil liegt in der ungewöhnlichen Temperaturbeständigkeit. Die maximale Betriebstemperatur liegt über 400°C . Bei Verwendung dieser unpolaren Phasen tritt mit polaren Substanzen, zu denen auch Antihistaminika gehören, häufig Tailing des Peaks auf (17, 18, 19). Der Peak des Antazolins, das eine lange Retentionszeit hat, ist bis zur Unkenntlichkeit deformiert.

Eine bessere Peakform erzielt man mit den polaren Phasen SP1000, SP2250, XE60 und OV 225. Bei SP1000 handelt es sich um eine bis 275°C beständige Modifikation der Phase Carbowax 20m/2-Nitroterephthalsäure und bei SP2250 um ein Methylphenylsilikonöl ähnlich wie OV 17, jedoch mit einer geringeren Viskosität. Die Phase mit der Bestell-Nr. 01-1983 ist für die Analyse von basischen Substanzen entwickelt (Abb. 20, 21, 22). Mit diesen beiden Trennflüssigkeiten lassen sich bis auf wenige Ausnahmen sämtliche Antihistaminika sicher unterscheiden. In Tabelle 9 sind die Retentionszeitdifferenzen der schwer trennbaren Paare angeführt. Zusammen mit den Cyanosilikongummiphasen XE60 und OV225 ist eine Identifizierung sämtlicher hier behandelter Antihistaminika möglich.

XE60 und OV225 sind vor allem dann vorteilhaft, wenn die Retentionszeit der fraglichen Substanz auf anderen Phasen wenig größer als die von Coffein ist und der Peak dem von Coffein aufsitzen würde. Coffein ist gewöhnlich im Harn in einer wesentlich höheren Konzentration als das Antihistaminikum vorhanden.

Abb. 17, 18, 19 Gaschromatogramme einiger Antihistaminika auf Dexsil

Bedingungen:

Gerät: Pye 104

Säule: 5 ft 1 % Dexsil 300

Einspritztemperatur 240° C

Ofentemperatur 208° C 60 ml N₂/min

Detektor FID, D-Temperatur 270° C, 30 ml H₂/min,
500 ml Luft/min

Eingesetzte Menge: 1 µg Antihistaminikumsalz
in wässriger Lösung

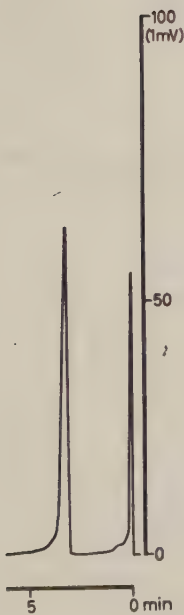


Abb. 17 Diphenylpyralin

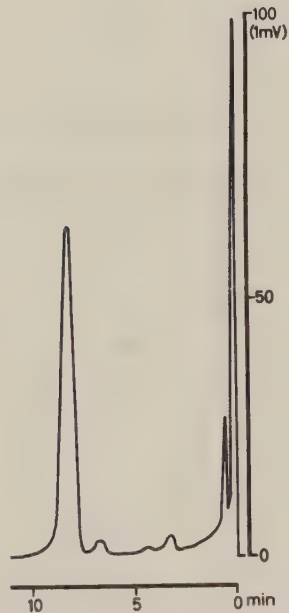


Abb. 18 Adeptolon^(R)

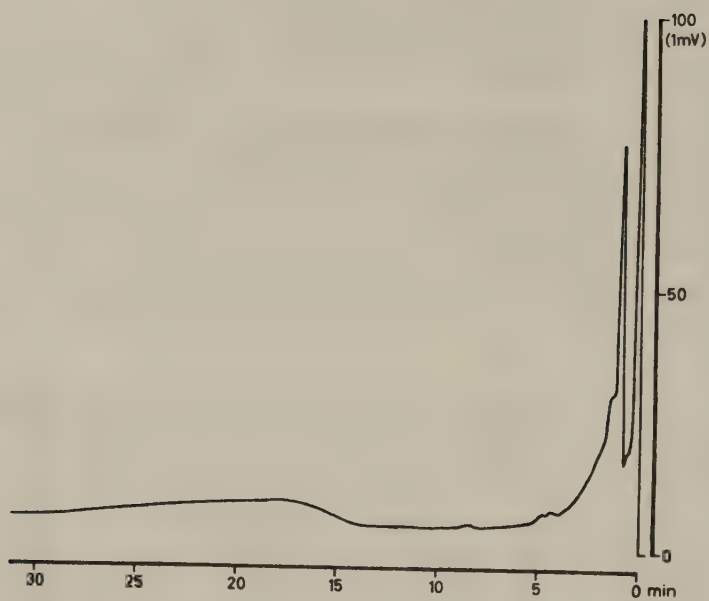


Abb. 19 Antazolin

Abb. 20,21,22 Gaschromatogramme einiger Antihistaminika
auf SP 2250

Bedingungen:

Gerät: Pye 104

Säule: 5 ft 3 % SP 2250

Einspritztemperatur 240° C

Ofentemperatur 225° C, 60 ml N₂/min

Detektor FID, D-Temperatur 270° C, 30 ml N₂/min,

500 ml Luft/min

Eingesetzte Menge: 1 µg Antihistaminikumsalz
in wässriger Lösung

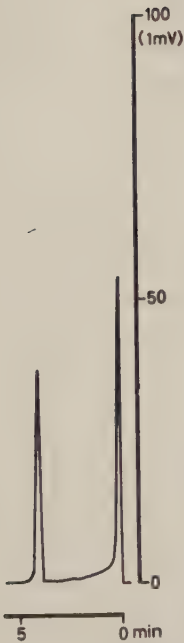


Abb. 20 Diphenylpyralin

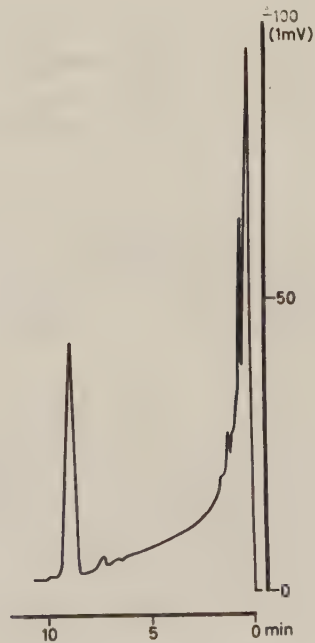


Abb. 21 Adeptolon^(R)

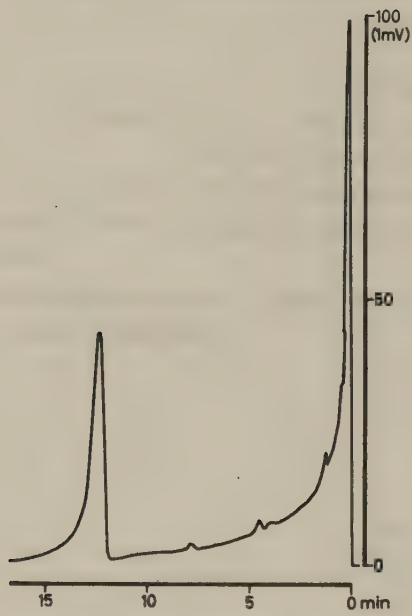


Abb. 22 Antazolin

Tab. 9 Unterschiede der Retentionszeiten bestimmter Antihistaminika-kombinationen auf drei stationären Phasen. Rt(min)

		SP2250	SP1000	OV225
Bamipin	- Bromopyramin	0,2	0,4	0,55
Bamipin	- Dimetinden	0,2	0,5	0,85
Bamipin	- Mepyramin	0	0,45	0,65
Bamipin	- Thenalidin	0,2	0,25	0,35
Bromopyramin	- Thenalidin	0	0,15	0,2
Brompheniramin	- Carbinoxamin	0,2	0,1	0,25
Brompheniramin	- Diphenylpyralin	0	0,3	0,35
Carbinoxamin	- Diphenylpyralin	0,2	0,2	0,1
Chloropyramin	- Phenindamin	0,1	0,5	1,4
Dexchlorpheniramin	- Methapyrilen	0,2	0,15	0,15
Dimetinden	- Mepyramin	0,2	0,03	0,2
Diphenhydramin	- Pheniramin	0,1	0,25	0,1
Histapyrrocin	- Thenalidin	0,2	0,5	0,75
Mepyramin	- Thenalidin	0,2	0,2	0,3
Methapyrilen	- Tripelennamin	0,1	0,2	0,25

Das Coffein stammt nicht nur aus dem Genuß coffeinhaltiger Getränke, sondern es ist auch sehr oft ein Bestandteil der Arzneimittellzubereitung. Die meisten Antihistaminika wirken leicht sedierend. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, enthalten die für die Einnahme am Tag bestimmten Arzneiformen häufig Coffein.

XE60 und OV225 unterscheiden sich von den gebräuchlichen stationären Phasen durch hohe polare Wechselwirkungskräfte für die Carbonylfunktion. Im System nach Rohrschneider zur Charakterisierung von Trennflüssigkeiten zeigt sich dies durch einen hohen Wert der mit Methyläthylketon bestimmten Konstante z (71). Daher wird eine Substanz mit mehreren Carbonylgruppen, wie Coffein, auf den Nitrilsilikonphasen länger zurückgehalten und die fragliche Substanz vorher eluiert.

In der Literatur finden sich bei gleichen stationären Phasen verschiedene Retentionszeiten für Antihistaminika, bei deren Ermittlung unterschiedliche

Belegung, Säulentemperatur und Strömung angewandt wurden. Zur Prüfung der Frage, ob eine gaschromatographische Trennung hauptsächlich von der Art der stationären Phase abhängt, wurden die Angaben der Literatur und die eigenen Werte auf Diphenhydramin bezogen (Tab. 10, 11, 12). Dabei ist bis auf wenige Ausnahmen eine Übereinstimmung der relativen Retentionszeiten festzustellen. Die größten Unterschiede finden sich bei Antazolin. Auf ungeeigneten Phasen wird neben der Substanz, die ein sehr starkes Tailing aufweist, ein Zersetzungsprodukt mit kurzer Retentionszeit eluiert (Abb. 19). Dieser Peak ist von einigen Autoren mit dem des unveränderten Arzneistoffes verwechselt worden.

Tab. 10 Relative Retentionszeiten (bezogen auf Diphenhydramin)

Stationäre Phase Literatur	2,5% SE30 (11)	2,5% SE30 (31)	2,5% SE30 (46)	1% SE30 (75)	1% SE30 (84)	0,07%SE30 (85)	SE30 eigene Unters.
Säuletemp. (°C)	210/2 m	225/5 ft	200/6 ft	180/6ft 225/6ft	173/6 ft	175/6 ft	200/5ft 230/5ft
Länge							
Adepton							5,4 4,6
Antazoln	4,0	3,8		4,8 4,8	0,5		4,8 4,1
Bamipin							3,6 3,3
Bromazin				2,9 3,0			2,7 2,4
Bromopyramin							3,8 3,3
Brompheniramin	2,1	2,0			2,2		2,3 2,3
Carbinoxamin		2,1				2,5	2,0 1,7
Chlorcyclozin	2,8	3,1 3,2			3,6	3,6	3,7 3,4
Chloropyramin				3,7 3,6	3,2 u.		2,9 2,6
Chlorphenoxamin		1,9					2,0 1,8
Clemastin							6,4 5,7
Cyproheptadin							5,2 4,7
Dexchlorpheniramin	1,5	1,5		1,6		1,8	1,5 1,4
Dimetinden		3,6					4,3 3,8
Diphenhydramin	1,0	1,0 1,0	1,0	1,0 1,0	1,0	1,0	1,0 1,0
Diphenylpyralin		2,0					2,3 2,1
Doxylamin		1,1			1,3	1,3	1,2 1,1
Histapyrroldin							4,0 3,4
Isothipendyl							3,9 3,7
Mebhydrolin	3,1	3,5 3,6					7,0 6,1
Meclozin		6,0		30,5			29,7
Mepyramin	3,0	3,1			4,1	4,5	3,5 3,3
Methapyrilen	1,3		1,5	1,6	1,3	1,6	1,5 1,4
Phenindamin	2,3	2,6					2,7 2,4
Pheniramin	0,9	0,9	1,5	0,8	0,6	0,8	0,8 0,7
Pyrrobutamin	5,1	5,4					6,8 5,4
Thenalinidin							3,6 3,4
Triptelennamin	1,3	1,3	1,4	1,6	1,1	1,6	1,5 1,4

Tab. 11 Relative Retentionszeiten (bezogen auf Diphenhydramin)

stationäre Phase temperatur / Länge	10% DC200 (113)	3% SP2250 eigene Unters.	1% Dexsil Unters.	3% XE60 (31)	225	3% XE60 eig. Unters.	1% XF1150 (84)	3% OV225 eig. Unters.	3% QF1 (75)
	210/4 ft.	228/5 ft.	210/5 ft.			190/5 ft	175/6 ft	200/5 ft	200/6 ft
deptonol		5, 4	6, 1			5, 7		6, 2	
antazolin		7, 5	ca. 13	1, 2		12, 3		13, 9	6, 6
amipin		4, 2	4, 3			4, 0		4, 4	
romazin		2, 7	3, 1			2, 8		2, 6	
romopyramin		4, 1	4, 3			4, 3		4, 9	
rompheniramin	2, 2	2, 4	2, 7	2, 5		2, 5		2, 7	
carbinoxamin		2, 2	2, 4			2, 4		2, 5	
chlorcyclizin	3, 3	3, 5	4, 1	3, 2		3, 4	2, 7	3, 7	2, 3
chloropyramin		3, 1	3, 4			3, 4	3, 8	3, 6	
chlorphenoxamin		2, 1	3, 4	1, 9		2, 0		2, 0	
lemastin		6, 2	7, 3			5, 4		5, 9	
pyroheptadin		5, 9	6, 1			5, 3		6, 2	
hexchlorpheniramin	1, 6	1, 8	1, 8	2, 0		1, 8	1, 7	1, 8	
dimetinden		4, 4	4, 6		4, 7	4, 4		5, 2	
iphenhydramin	1, 0	1, 0	1, 0	1, 0	1, 0	1, 0	1, 0	1, 0	1, 0
iphenylpyralin	2, 2	2, 4	2, 4	2, 1		2, 3		2, 4	
oxylamin		1, 2	1, 5	1, 4		1, 1	1, 1	1, 2	
istapyrrocin		4, 0	4, 2			3, 8		4, 1	
isothipendyl		4, 7	4, 9		5, 3	4, 2		5, 0	
tebhydrocin		9, 9	10, 1			12, 4		14, 5	
teclozin		34, 5	-			-		-	
tepyramin	3, 3	4, 2	4, 0			4, 4	6, 0	5, 0	
tethapyrilen	1, 5	1, 7	1, 7			1, 8	2, 0	2, 0	
phenindamin	2, 5 u. 2, 8	3, 3	3, 0		3, 0	3, 0		3, 3	
pheniramin	0, 8	0, 9	0, 9	0, 9		0, 8	0, 7	0, 9	0, 9
pyrrobutamin		6, 5	7, 8		12, 0	6, 5		7, 0	
phenalidin		4, 1	4, 8			4, 2		4, 7	
ripetennamin		1, 6	1, 6			1, 6	1, 6	1, 7	

3.6. Nachweis im biologischen Medium

3.6.1. Auswahl des Detektors

Nach den aufgeführten Angaben der Literatur über den Stoffwechsel der Antihistaminika werden sie im Körper weitgehend metabolisiert. Die unverändert ausgeschiedenen Wirkstoffe liegen neben einer sehr viel größeren Menge an störenden Begleitstoffen vor und können davon auch mit großem Aufwand nur teilweise abgetrennt werden. Beim Reinigen der Extrakte durch mehrere Verteilungsschritte sind Substanzverluste unvermeidbar. Wird zum Nachweis dagegen ein empfindliches und spezifisches Verfahren benutzt, ist eine einfache Aufarbeitung ausreichend. Ein solches Verfahren ist die Gaschromatographie in Verbindung mit einem spezifischen Detektor.

Der zur Spurenanalyse am häufigsten eingesetzte Detektor ist der Flammenionisationsdetektor. Er besitzt eine geringe Spezifität, da er alle Substanzen mit mindestens einer CH-Bindung anzeigt. Für diese Anwendung günstiger sind der Elektroneneinfang- und der Thermoionik-Detektor.

Der ECD gestattet es, Halogene empfindlich nachzuweisen. Darüber hinaus werden aber auch andere elektroneneinfangende Verbindungen angezeigt. Dazu gehören: elementarer Sauerstoff, sauerstoffhaltige Gruppen, Bleialkyle, kondensierte Aromaten, Substanzen mit Nitrogruppen, mit Schwefel und Mehrfachbindungen (91).

Der TID ist im Prinzip für alle mit der Lassaigne-Probe nachweisbaren Elemente empfindlich. Seine Selektivität kann variiert werden. Sie ist vom Alkalisalz, der geometrischen Anordnung, den Gasen für die Flamme, dem Trägergas und der Temperatur abhängig (5).

Die Empfindlichkeit der beiden im Pye 104 eingebauten Detektoren für die Antihistaminika wurde nach Optimierung verglichen. Als TID wurde die von Philips als Phosphordetektor in den Handel gebrachte Anordnung benutzt. Durch einen RbCl-Kristall statt des CsBr und eine entsprechende Wahl der H_2 - und Luftströmungen ließen sich stickstoffhaltige Verbindungen mit einer guten Selektivität (N/C 1 : 5000) und einer ausreichenden Empfindlichkeit nachweisen. Helium statt Stickstoff als Trägergas vergrößerte die Peakhöhen der N-Substanzen wenigstens auf das Doppelte.

Um die Empfindlichkeit von ECD und TID zu vergleichen, wurden in den Pye 104 zwei 5 ft Säulen mit 3 % SP2250 auf Supelcoport eingebaut und mit je einem Detektor verbunden. Auf die Säulen wurde jeweils etwa 1 μ g der Antihistaminikum-Base in ätherischer Lösung aufgegeben. Jedem Detektor war ein eigener Verstärker und Kompensationsschreiber zugeordnet. Aus den durch mehrere Einspritzungen ermittelten Mittelwerten der Peakhöhen bei gleicher Abschwächung wurde der Quotient ECD:TID gebildet (Tabelle 13).

Beim ECD kamen auch Ausschläge in Gegenrichtung vor. Bei diesen Substanzen ist der Quotient negativ. Der TID zeigte alle Antihistaminika mit etwa gleicher Empfindlichkeit an. Im Gegensatz dazu fanden sich beim ECD sehr große Unterschiede. Mit Ausnahme von Diphenhydramin wurde bei gleicher Verstärkung mit dem ECD das größere Signal erzielt.

Um ein Antihistaminikum neben den störenden Begleitstoffen eines Harnextraktes nachweisen zu können, muß die Empfindlichkeit des ECD für das Arzneimittel so hoch sein, daß sich sein Signal von dem des Untergrundes unterscheidet. Wie Versuche mit ätherischen Harnextrakten zeigten, ist das nur für Substanzen mit einem $Q_{\frac{\text{ECD}}{\text{TID}}}$ größer als 20 der Fall.

Die Anzeige des TID ist spezifischer, so daß er trotz einer geringeren Empfindlichkeit für den Nachweis von Arzneimitteln im biologischen Medium besser geeignet ist. Zudem lassen sich alle Antihistaminika mit etwa gleicher Empfindlichkeit nachweisen, da die Anzeige nicht von der Struktur, sondern lediglich vom Stickstoffäquivalent abhängig ist (58).

Für die weiteren Versuche wurde daher der Thermoionikdetektor eingesetzt.

Tab. 13 Verhältnis der Signalgrößen ($Q \frac{ECD}{TID}$)

Adeptolon	52		
Antazolin	-		
Bamipin	4		
Bromazin	90		
Bromopyramin	39		
Brompheniramin	45		
Carbinoxamin	18		
Chlorcyclizin	- 10	<u>Bedingungen:</u>	
Chloropyramin	14	<u>ECD</u> Säule:	3 % SP2250 auf Supelcoport
Chlorphenoxamin	12		100/120
Clemastin	28	Säulentemp.:	228° C
Cyproheptadin	- 26	Trärgas:	40 ml/min N ₂
Dexchlorpheniramin	22	Purge-Gas:	20 ml/min N ₂
Dimetinden	24	⁶³ Ni-Detektor:	270° C
Diphenhydramin	0,1	puls space:	150 µs
Diphenylpyralin	- 7		
Doxylamin	12	<u>TID</u> Säule:	3 % SP2250 auf Supelcoport
Histapyrrocin	17		100/120
Isothipendyl	18		
Mebhydrolin	- 6	Säulentemp.:	228° C
Mepyramin	36	Trärgas:	60 ml/min He
Methapyrilen	16	Detektor:	270° C
Phenindamin	11	Brenngase	
Pheniramin	2	H ₂ :	30 ml/min
Pyrrobutamin	17	Luft:	180 ml/min
Thenalidin	10		
Tripeleennamin	8		

3.6.2. Untersuchungen zur Nachweisbarkeit von Antihistaminika im Urin

Es sind bisher nur wenige Versuche beschrieben, mit Hilfe der Gaschromatographie Antihistaminika nach therapeutischen Dosen im Urin des Menschen nachzuweisen. ALBERT u. WINDHEUSER (3) und BECKETT u. WILKINSON (12) bestimmten die Ausscheidung von Chlorpheniramin. BRUCE, PITTS u. PINCHBECK (20) gaben ein Verfahren zum empfindlichen Nachweis von Brompheniramin im Urin an, und KABASAKALIAN, TAGGART u. TOWNLEY (70) verglichen die gaschromatisch bestimmte Ausscheidung von Pheniramin mit der von Brom- und Chlorpheniramin. SCHIRMER u. PIERSON (116) konnten mit einem schwefelspezifischen flammenphotometrischen Detektor nach Einnahme von Methapyrilen im Urin eine Substanz mit der gleichen Retentionszeit nachweisen, bei der es sich jedoch um einen hydroxylierten Metaboliten handeln soll.

Nachdem mit der Gaschromatographie und dem Thermoionikdetektor eine empfindliche und spezifische Methode zur Verfügung stand, wurde angestrebt, sämtlichen behandelten Antihistaminika mit Ausnahme von Meclozin und Bromopyramin im Urin nachzuweisen. Meclozin besitzt bei den benutzten Bedingungen eine Retentionszeit von einer Stunde. Bromopyramin ist nur in Form von Hibernon Salbe im Handel. Ein Auftreten im Urin ist nur nach Auftragen der Salbe auf einen entzündlich geröteten Bezirk von mehr als 10 % der Körperfläche zu erwarten (93).

Zur Extraktion des Urins wurde eine einfache Verteilung in Äther benutzt, die sich in Zusatzversuchen zu Urin als ausreichend erwiesen hatte. Wegen der geringen ausgeschiedenen Mengen konnte jedoch trotz hoher Empfindlichkeit nicht wie bei der Dopinganalyse nach DONIKE u. Mit. (41) auf eine Konzentrierung der Extrakte durch Eindampfen verzichtet werden. Die GC-Bedingungen wurden gegenüber den vorherigen Versuchen geändert, um unter Verzicht auf optimale Selektivität eine große Empfindlichkeit zu erreichen.

3.6.2.1. Versuche zur Nachweisbarkeit im Urin nach therapeutischer Dosierung

Von Versuchspersonen wurde am Morgen ein Stück der in Tabelle 14 ange-

gegebenen Zubereitungen eingenommen. Auf den Genuß von coffeinhaltigen Getränken wurde während des Versuchs nicht verzichtet, um praxisnahe Verhältnisse einzuhalten. Zudem enthalten, wie oben erwähnt, die zur Einnahme am Tag bestimmten Zubereitungsformen der Antihistaminika häufig Coffein.

Der nach etwa 3 Stunden gelassene Urin wurde wie in der Arbeitsvorschrift VI beschrieben untersucht.

GC-Bedingungen:

Gerät: Philips Pye 104
 5 ft Glassäule mit 3 % SP2250
 Temperaturen: Einspritzblock ca 240° C, Ofen 220° C,
 Detektor 270° C
 Gase: 90 ml/min He, 30 ml/min H₂, ca 400 ml/min Luft
 Abschwächung: 20

Das Ergebnis der Untersuchung findet sich in Tabelle 14. Bei den Substanzen, die mit einem oder mehreren Pluszeichen gekennzeichnet sind, fand sich in den Urinextrakten eine Substanz mit der Retentionszeit der Reinsubstanz. Falls in den Leerharnextrakten eine Substanz mit gleicher oder ähnlicher Retentionszeit vorkam, ist der entsprechende Befund eingeklammert.

Die Resultate der Versuche über die Nachweisbarkeit zeigen, daß die Schwierigkeit beim Nachweis geringer Arzneistoffkonzentrationen im biologischen Material nicht in der fehlenden Empfindlichkeit der Methode begründet ist. Für eine wässrige Tripelemininlösung wurde eine untere Nachweisgrenze von ca 20 pg pro Injektion erreicht. Auch eine Steigerung der N-Spezifität kann keine Verbesserung bringen, da es sich bei den störenden Begleitsubstanzen um Stoffwechselprodukte körpereigener Substanzen und um Coffein und seine Metaboliten handeln dürfte. Bei den Substanzen mit ähnlichen Retentionszeiten wie die Antihistaminika kommen vor allem Tryptophanmetaboliten, wie Tryptamin und Harman, in Frage. Sie wurden von STEVENS und EVANS (127) in faulenden Geweben nachgewiesen. Nach BUR-TIS und WARREN (24) kommen solche Verbindungen jedoch in kleinerer Menge auch in frischem Urin vor.

Tab. 14 Nachweisbarkeit von Antihistaminika nach therapeutischer Dosierung

Wirkstoff	zugeführte Menge (mg)	Nachweis	Spezialität	Zubereitungsform
Adeptolon	15	+	Adeptolon	Dragees
Antazolin	100	+++	Antistin	Tabletten
Bamipin	50	(+)	Soventol C	Tabletten
Bromazin	25	+	Ambodryl	Siegelkapseln
Brompheniramin	16 (7+9)	+	Ilvin	Retarddragees
Carbinoxamin	4	(+)	Rhinopront	Depotkapseln
Chlorcyclizin	50	++	Diparalene	Filmtabletten
Chloropyramin	25	(+)	Synpen	Dragees
Chlorphenoxamin	20	(+)	Systral C	Dragees
Clemastin	1	(-)	Tavegil	Tabletten
Cyproheptadin	4	(-)	Periactinol	Tabletten
Dexchlorpheniramin	2	(+)	Polaronil	Tabletten
Dimetinden	2,5	(-)	Fenistil	Retardtabletten
Diphenhydramin	25	++	Dabylen	Dragees
Diphenylpyralin	3	+	Kolton	Tabletten
Doxylamin	25	+++	Mereprine	Dragees
Histapyrrodin	20	(+)	Calcistin	Dragees
Isothipendyl	4	-	Andantol	Dragees
Mebhydrolin	50	+	Omeril	Dragees
Mepyramin	100	(++)	Neo-Bridal	Dragees
Methapyrilen	25	(+)	Copyronilum	Depotkapseln
Phenindamin	25	+	Thephorin	Dragees
Pheniramin	10	+++	Avil	Tabletten
Pyrrobutamin	15	-	Copyronilum	Depotkapseln
Thenalidin	25	+++	Sandosten-Calcium	Brausetabletten
Tripeleennamin	50	(++)	Pyribenzamin	Tabletten

Das Coffein kann sowohl aus coffeinhaltigen Getränken als auch aus Arzneimitteln stammen. Nach der Peakhöhe war die Coffeinkonzentration im Ätherextrakt in der Regel 100x größer als die des Antihistaminikums.

Über den Metabolismus von Coffein beim Menschen liegen unterschiedliche Angaben der Literatur vor. CORNISH und CHRISTMAN (35) geben als Hauptmetaboliten 1-Methylharnsäure und 1-Methylxanthin an, nach SCHMIDT und SCHOYRER (117) sind es dagegen Theobromin und 1,7Dimethylxanthin.

Weitere Xanthin- und Harnsäurederivate entstehen im Purinstoffwechsel aus Adenin und Guanin (73).

Von der apparativen Seite ist dieses Problem nur durch eine substanzspezifische Methode, wie sie die Gaschromatographie mit anschließender massenspezifischer Detektion darstellt, zu lösen. Wegen der hohen Kosten dieser Geräte wird dieser Nachweis jedoch auch in Zukunft nur selten eingesetzt werden können. Eine Erhöhung der Sicherheit der Identifizierung ist jedoch leicht zu erreichen, wenn es gelingen würde, die Selektivität der Extraktion zu steigern.

3.6.2.2. Versuche zur selektiven Extraktion einiger Antihistaminika

Im alkalischen Ätherauszug von Leerharn traten die oben erwähnten Störsubstanzen auf, deren Konzentration sich weder durch vorherige saure Ätherextraktion noch durch Rückschütteln des alkalischen Auszugs in 0,5n H_2SO_4 , Realkalisieren und nochmalige Ätherextraktion wesentlich verringern ließ (Abb. 23). Zur Prüfung anderer Extraktionsmittel wurden jeweils 5 ml Harn mit 1 μg Bamipin und Chlorphenoxamin versetzt und mit 5 ml verschiedener Lösungsmittel aus Natriumkarbonatalkalischem Medium extrahiert. Bei Anwendung von n-Hexan, Cyclohexan, Benzol und Schwefelkohlenstoff konnten die Antihistaminika nicht im Extrakt der organischen Phase nachgewiesen werden. Dichlormethan brachte dagegen eine gute Ausbeute und eine Verringerung der störenden Begleitstoffe. Es wurde daraufhin eine neue Methode VII ausgearbeitet.

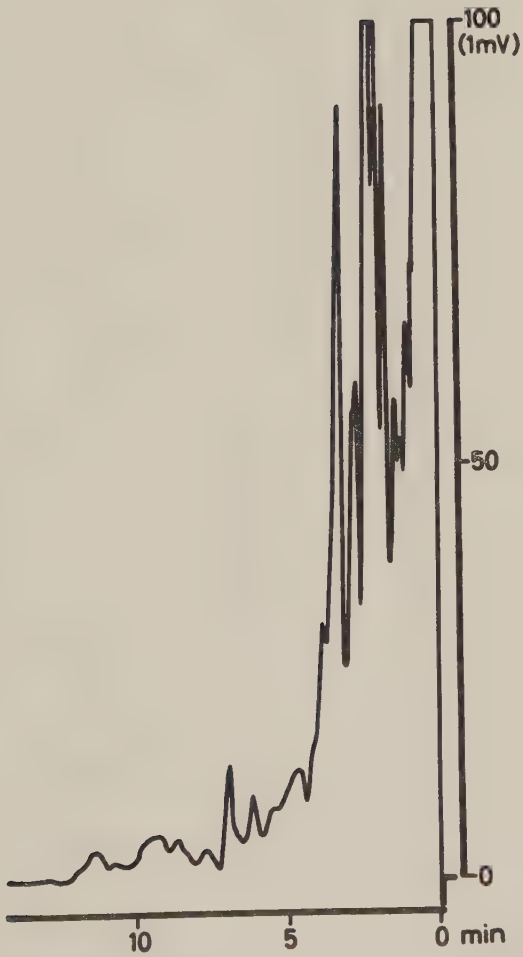


Abb. 23 Gaschromatogramm eines Ätherextraktes von 5 ml Leberharn (Methode VI)

Gerät Pye 104 Säule 3 % SP 2250
 TID, Abschwächung 20, Menge 1 μ l
 übrige Parameter Tab. 8

3.6.2.3. Versuche zur Aufstellung einer Eichkurve für zwei Antihistaminika nach Dichlormethanextraktion

Die mit Dichlormethan gewonnenen Harnextrakte enthalten weniger mitextrahiertes Fremdmaterial, als die nach VI hergestellten. Es wurde daher untersucht, ob sich mit Dichlormethan einige der Antihistaminika bestimmen lassen, die im Ätherextrakt nicht sicher nachweisbar waren. Zu diesen gehören Bamipin und Chlorphenoxamin, die in Deutschland unter den Warenzeichen Soventol und Systral zu den meistgebrauchten Antihistaminika zählen und für die keine Stoffwechseluntersuchungen vorliegen.

Zur Bestimmung dieser beiden Substanzen wurden Mengen von 0,2–2 µg der Wirkstoffe als Hydrochloride und 1 µg Cyproheptadin HCL als innerer Standard zu 5 ml Leiharn gegeben und nach VII extrahiert. Die Konzentration der zugesetzten wässrigen Lösungen betrugen bei Bamipin und Chlorphenoxamin 1 und 10 µg/ml, beim inneren Standard 10 µg/ml. Wenn im Chromatogramm der zu bestimmende Peak von einer Störsubstanz nicht ausreichend getrennt war, wurde durch Tangentenbildung die Grundlinie graphisch festgelegt. Aus den Peakhöhen von Bamipin und Chlorphenoxamin bei 6 verschiedenen Konzentrationen und der des inneren Standards wurden Quotienten zur Aufstellung einer Eichkurve gebildet, die sich in umfangreichen Versuchen jedoch als nicht reproduzierbar erwiesen. Eine Erklärung dafür bietet die Adsorption der Basen an der Glaswand und die Schwierigkeit, die kleinen Konzentrationen neben den auch nach VII vorkommenden störenden Begleitstoffen zu bestimmen (Abb. 24). Die adsorbierten Anteile waren nach dem Eindampfen zur Trockne auch durch 10maliges Spülen mit Methanol nicht vollständig von der Glaswand zu lösen. Die Antihistaminika sind relativ polar und werden aus einem unpolaren Lösungsmittel vom Glas adsorbiert. Ist jedoch in der Lösung eine polare Substanz, z.B. Alkohol vorhanden, soll dieser Effekt unterdrückt werden (WALLE et al. 135, DILL u. GLAZKO 40).

Um ein Eindampfen zur Trockne und die Adsorption zu verhindern, wurden in einem Versuch vor dem Einengen bei 40° C dem Dichlormethanextrakt 0,1 ml n-Propanol zugesetzt. Der Alkohol sollte gleichzeitig eine Verbesserung des Rückspüleffektes bewirken. Die gewünschte Reproduzierbarkeit der Quotienten konnte damit jedoch auch nicht erreicht werden. Der zweite Grund für die schlechten Ergebnisse bei der Aufstellung der Eichkurve war

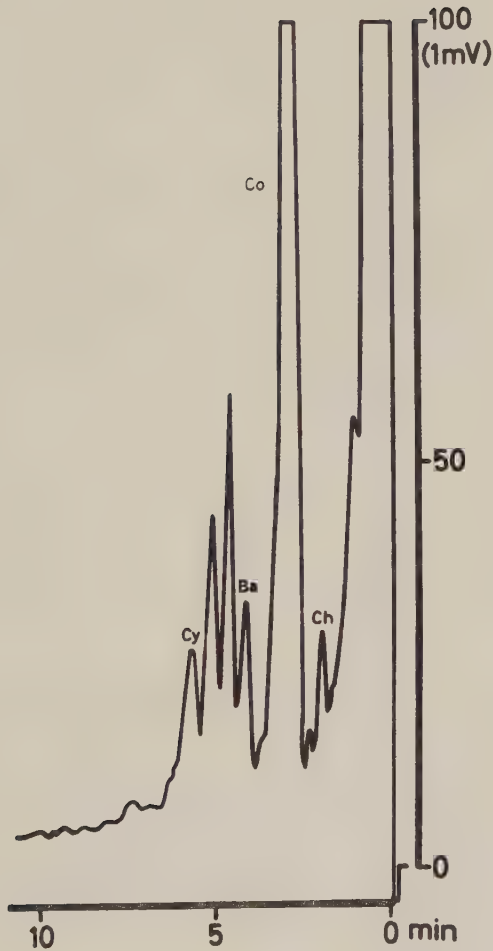


Abb. 24 Gaschromatogramm eines Dichlormethanextraktes von 5 ml Leerharn mit Zusatz von 0,5 μ g Bamipin und Chlorphenoxamin und 1 μ g Cyproheptadin (Methode VII)

Gerät: Pye 104 Säule: 3 % XE 60
 TID, Abschwächung 50, Menge 3 μ l
 übrige Parameter Tab. 8
 (Ba = Bamipin, Ch = Chlorphenoxamin, Co = Coffein,
 Cy = Cyproheptadin)

die zu große Menge an störenden Begleitsubstanzen. Um diese zu verringern, wurde vor der Dichlormethanextraktion eines Leerharns, dem 0,1 ml innerer Standards zugesetzt war, mit n-Hexan ausgeschüttelt. Im Chromatogramm des CH_2Cl_2 -Extraktes zeigte sich, daß die Störstoffe in ihrer Konzentration etwa gleich geblieben, die Menge an innerem Standard jedoch deutlich verringert war. Daraufhin wurde sowohl Leerharn mit Cyproheptadin als auch solcher, dem 0,5 µg Bamipin und Chlorphenoxamin und der innere Standard zugesetzt waren, bei ammoniakalischer Reaktion mit einem n-Hexan/2Methylbutanol(1) 99:1 Gemisch extrahiert, bei 80° C eingedampft und in n-Propanol aufgenommen. Der Zusatz von 2-Methylbutanol(1) erfolgte zur Verhinderung der Adsorption und zur Erhöhung der Extrahierbarkeit, da vorherige Versuche mit n-Hexan allein bei Bamipin und Chlorphenoxamin keine befriedigende Ausbeute ergeben hatten.

Bei diesen Versuchen wurde mit 0,1 ml konzentrierter Ammoniaklösung alkalisch gemacht. Mit dieser Menge wurde bei 5 ml eines schwach sauren Urins ein pH von 9,5 erzielt. Vorangehende Untersuchungen bei der Extraktion mit Dichlormethan hatten ergeben, daß die Verwendung von 0,1 ml konzentrierter Ammoniaklösung statt 0,1 ml gesättigter Natronlauge zu vergleichbaren Ausbeuten führt.

Das Ergebnis des Extraktionsversuchs war ungewöhnlich (Abb. 25, 26). Im Chromatogramm des Leerharns mit innerem Standard kamen Fremdsubstanzen nur noch in geringer Konzentration vor; vor allem war die Höhe des Coffeinpeaks im Vergleich zum Äther- und Dichlormethanextrakt um den Faktor 100 bis 1000 geringer. Sie war halb so groß wie die des inneren Standards. Die Peakhöhe der anderen mitextrahierten Begleitstoffe war noch kleiner. Die Extraktionsausbeute der zugesetzten Antihistaminika war dagegen besser als 90 %.

Um die Extrakte bei einer niedrigeren Temperatur eindampfen zu können, wurde für die folgenden Versuche ein n-Pentan/2-Methylbutanol(1) 99:1 Gemisch verwandt, dem vor dem Eindampfen bei 38° C 0,1 ml n-Propanol zugesetzt wurden, um einen ausreichenden Rückspüleffekt sicherzustellen. Mit diesem Lösungsmittelgemisch war die Ausbeute ebenso gut; der Anteil an Störsubstanzen war gleich oder etwas geringer. Im Urinextrakt eines vierjährigen Kindes traten so gut wie keine Störpeaks auf (Abb. 27), so daß der Hauptanteil der in Urinen von Erwachsenen bei dieser Methode noch

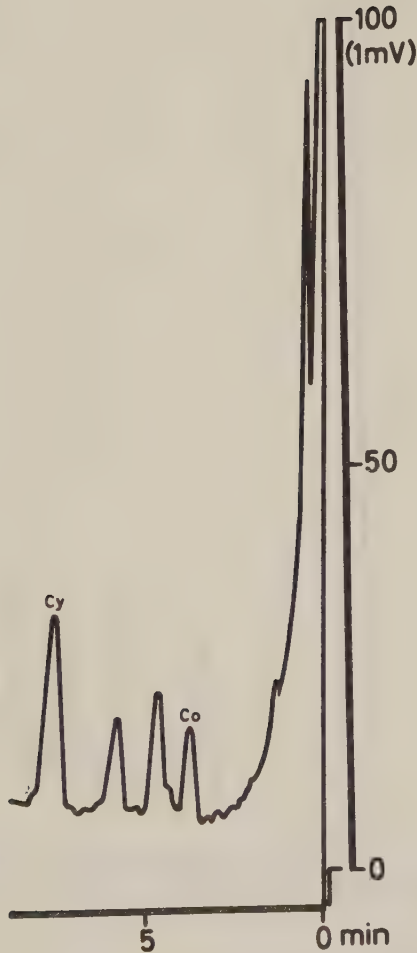


Abb. 25 Gaschromatogramm eines n-Hexan/2-Methylbutanol(1) Extraktes von 5 ml Leerharn mit Zusatz von 1 μ g Cyproheptadin-HCl

Gerät Pye 104 Säule: 3 % OV 225
 TID, Abschwächung 50, Menge 3 μ l
 übrige Parameter Tab. 8

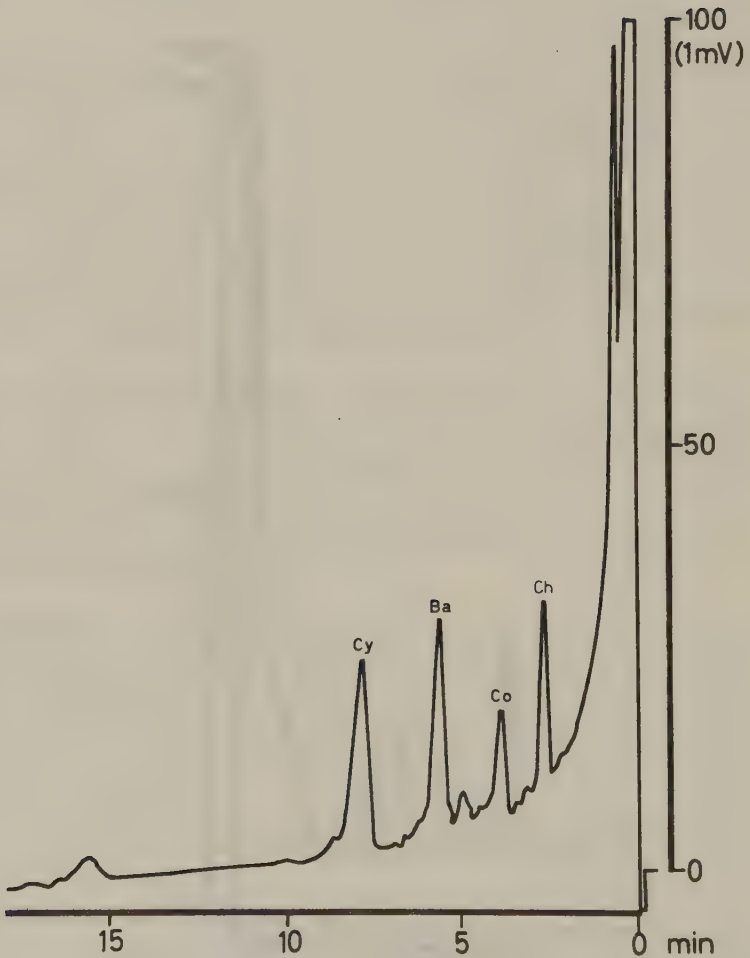


Abb. 26 Gaschromatogramm eines n-Hexan/2Methylbutanol(1) Extraktes von 5 ml Leerrharn mit Zusatz von 0,5 μ g Bamipin-HCl und Chlorphenoxamin-HCl und 1 μ g Cyproheptadin-HCl
übrige Bedingungen wie Abb. 25

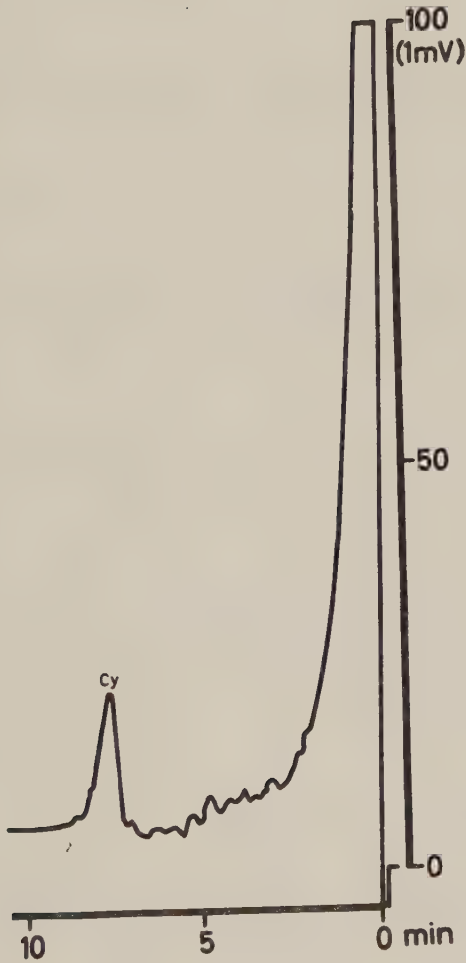


Abb. 27 Gaschromatogramm eines n-Pentan/2-Methylbutanol(1) Extraktes von 5 ml Urin eines 4-jährigen Kindes mit Zusatz von 1 μ g Cyproheptadin-HCl (Methode VIII)
übrige Bedingungen wie Abb. 25

vorkommenden Peaks auf den Coffeingehalt zurückzuführen sein dürfte. Nach diesen Ergebnissen wurde die unter VIII beschriebene Methode ausgearbeitet.

3.6.2.4. Bestimmung der Ausscheidung von Bamipin und Chlorphenoxamin im Urin

3.6.2.4.1. Aufstellung von Eichkurven mit Pentan/2-Methylbutanol(1) Extraktion

Nachdem mit der Pentan/2-Methyl-1-butanol Extraktion ein Verfahren gefunden war, um schnell und einfach geringe Arzneimittel mengen aus Harn selektiv abzutrennen, wurde diese Methode zur quantitativen Bestimmung benutzt.

Zur Aufstellung einer Eichkurve wurden Bamipin HCl und Chlorphenoxamin-HCl in Mengen von 0,2-2 µg und 1 µg CyproheptadinHCl zu 5 ml Harn gegeben und mit der gleichen Menge Extraktionsgemisch ausgeschüttelt. Die weitere Ausarbeitung entsprach dem unter VIII angegebenen Verfahren. Aus dem Peakhöhenverhältnis von Bamipin und Chlorphenoxamin zum internen Standard und der jeweiligen zugefügten Menge der Antihistaminika wurden die Regressionsgeraden errechnet. Für Bamipin ergab sich $y=2,88x-0,23$ und für Chlorphenoxamin $y=2,74x-0,23$. Für beide Gleichungen betrug der Korrelationskoeffizient $r=0,99$. Die Anzahl der Bestimmungen war im ersten Fall $n=30$, im zweiten Fall $n=29$.

3.6.2.4.2. Versuche nach Drageeinnahme

Die Versuchspersonen nahmen ein Stück der jeweiligen Zubereitungen morgens nach dem Frühstück ein. Der Genuß von coffeinhaltigen Getränken war nicht eingeschränkt. Der Leerharn kurz vor der Einnahme und die während 24 Stunden produzierten Harnmengen wurden getrennt gesammelt und entsprechend VIII aufgearbeitet. Die Werte wurden durch Vierfach-Bestimmung gesichert. Im Leerharn wurden keine die Untersuchung störenden Stoffe gefunden. Der Verlauf der Ausscheidung ist in den folgenden Tabellen und Grafiken wiedergegeben.

Tab. 15 Verlauf der Ausscheidung bei Versuchsperson A nach Aufnahme von 20 mg Chlorphenoxamin-HCl (1 Drg. Systral C) am 24. u. 25. 1. 1974

Uhrzeit	Zeit nach Aufnahme(n)	Urin-Menge in ml	x ph	µg/l	Gesamtmenge (µg)
8 ²⁵	-	75	5,5	0	0
8 ³⁰	0				Einnahme von 1 Drg. Systral C
10 ¹⁵	1,75	140	6,0	10,6	1,5
13 ²⁵	4,9	316	6,5	10,6	3,3
15 ³⁰	7,0	230	6,8	10,6	2,4
17 ⁰⁵	8,6	83	6,5	21,2	1,8
20 ³⁰	12,0	111	5,5	52,8	5,9
22 ⁰⁰	13,5	232	5,5	44,8	10,4
6 ⁴⁵	22,25	355	5,5	26,8	9,5
9 ³⁰	25,0	270	6,5	17,8	4,8
11 ¹⁵	26,75	418	5,5	13,8	5,8

Tab. 16 Verlauf nach Ausscheidung bei Versuchsperson v. M. nach Aufnahme von 25 mg Bamipin-HCl (1 Drg. Soventol C) am 24. u. 25. 1. 1974

Uhrzeit	Zeit nach Aufnahme(n)	Urin-Menge in ml	x ph	µg/l	Gesamtmenge (µg)
8 ⁰⁵	-	124	6,5	0	
8 ²⁰	0				Einnahme von 1 Drg. Soventol C
9 ²⁵	1,1	126	6,8	17,4	2,2
11 ⁵⁵	3,6	140	7,0	32	4,5
15 ⁰⁰	6,7	140	7,0	31,2	4,4
17 ¹⁰	8,8	78	6,5	103,4	8,1
19 ⁴⁵	11,4	126	5,5	300	37,8
21 ⁰⁵	12,75	102	5,5	172	17,5
8 ³⁰	24,2	450	6,0	119	53,4

xBestimmung mit Lyphan Indikatorpapier Machery & Nagel

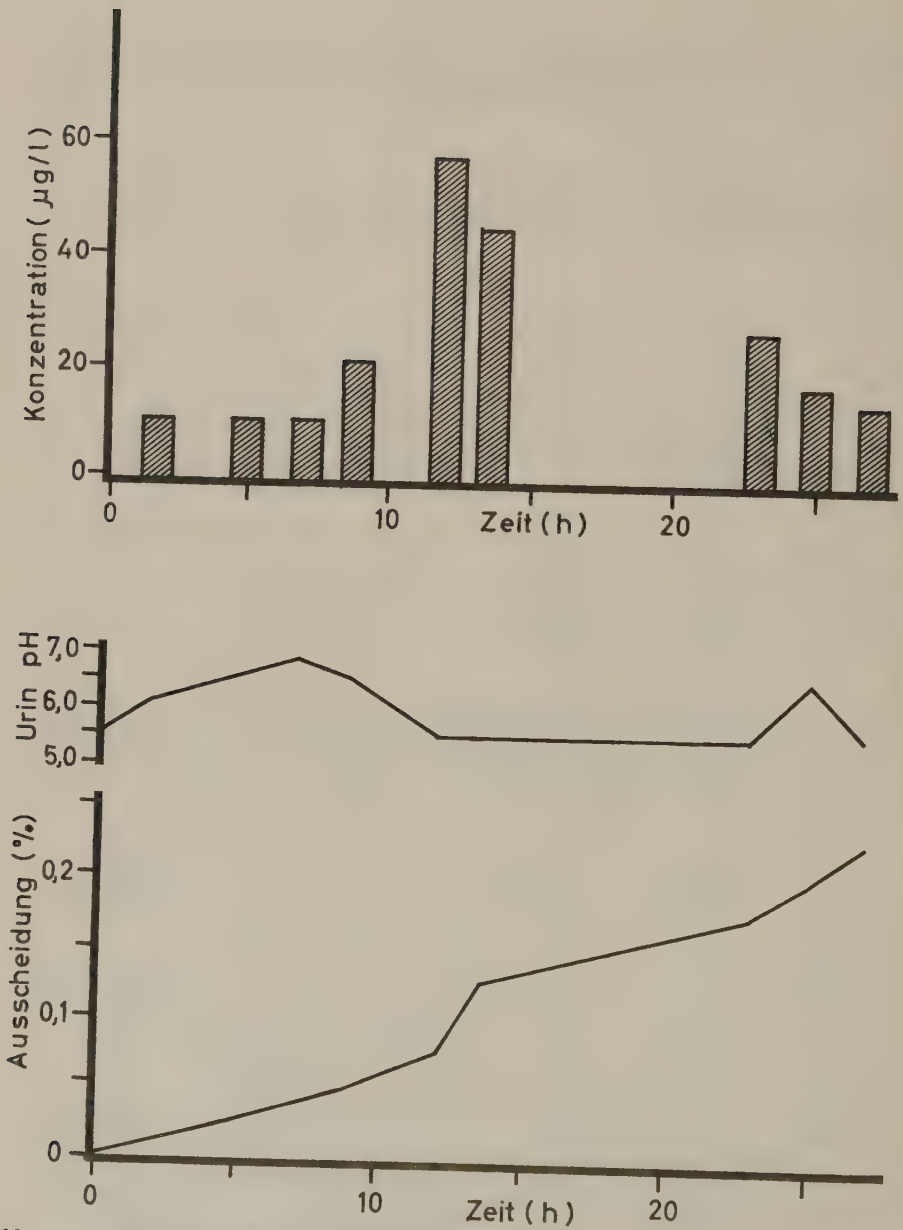


Abb. 28 Ausscheidung von Chlorphenoxamin
oben: Konzentration, mitte Urin pH,
unten Summe in % der eingenommenen Dosis

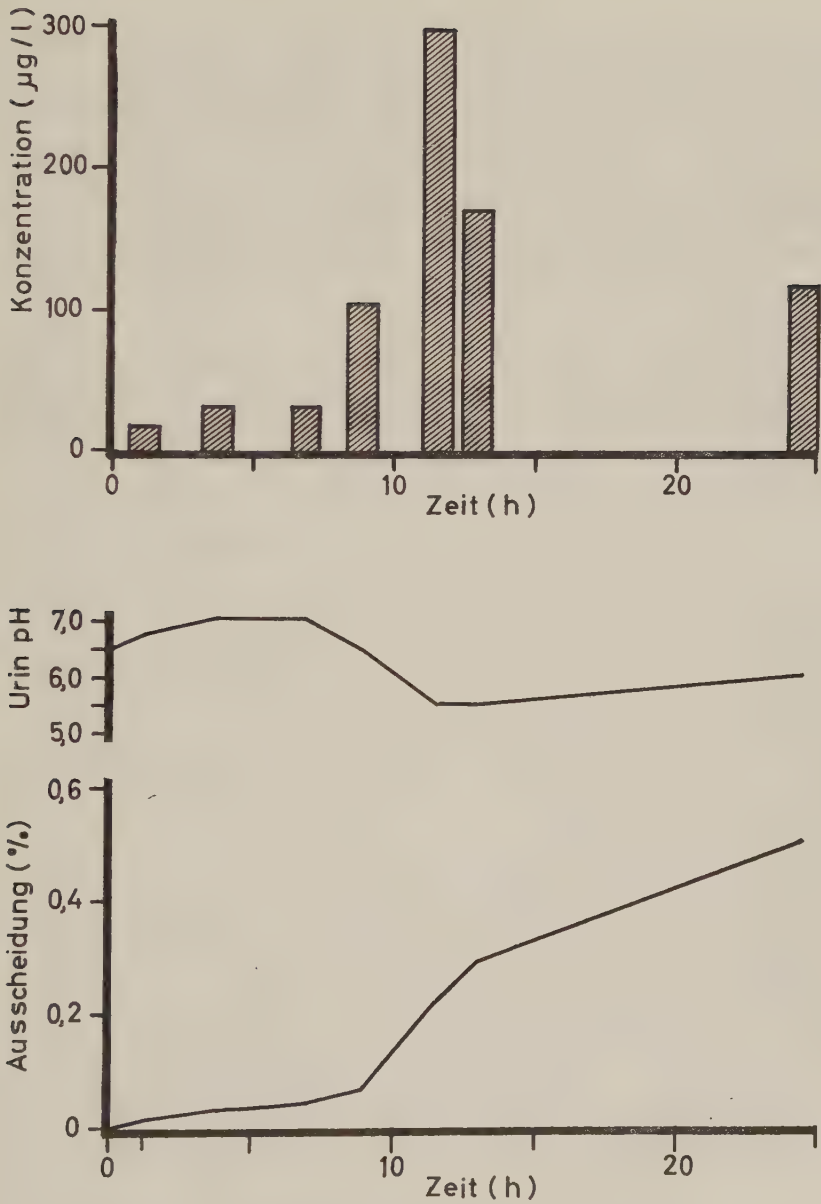


Abb. 29 Ausscheidung von Bamipin
oben Konzentration, mitte Urin pH,
unten Summe in % der eingenommenen Dosis

Das Versuchsergebnis läßt auch bei Bamipin und Chlorphenoxamin die Abhängigkeit der Ausscheidung vom Urin-pH erkennen, wie es von BECKETT u. WILKINSON (12) schon für die Amphetamine und das Antihistaminikum Chlorphenamin gezeigt wurde. Die höchste Konzentration tritt in den hier untersuchten Fällen erst nach ca. 12 Stunden auf, was möglicherweise durch eine mit der Nahrungsaufnahme zusammenhängende pH-Verschiebung verursacht wird.

Die in 24 Stunden ausgeschiedenen Mengen von 0,2 bzw. 0,5 % der eingenommenen Dosis sind gering. Dennoch ist ein Nachweis der Einnahme über 24 Stunden hinaus möglich. Anhaltspunkte für die Ausscheidung von Metaboliten wurden bei diesen Untersuchungen nicht gefunden.

3.6.2.5. Bestimmung der Ausscheidung von Dimetinden im Urin

Dimetinden gehört zu den niedrigst dosierten Antihistaminika. Es finden sich in der Literatur keine Angaben über den Nachweis im Urin des Menschen. Mit dem unter VIII beschriebenen Verfahren wurde eine Eichkurve aufgestellt und die Regressionsgerade berechnet. Es wurden zwischen 20 und 200 ng Dimetindenmaleat zu 5 ml Harn gegeben. Als innerer Standard diente eine Lösung mit 1 µg/ml Cyproheptadin-HCl, von der 0,1 ml zugesetzt wurden. Aus 23 Bestimmungen ergab sich die Eichgerade $y=11,71x + 0,03$. Der Korrelationskoeffizient war 0,97.

Zur Untersuchung der Ausscheidung wurde 1 mg Dimetinden eingenommen. Die übrigen Bedingungen waren von der niedrigen Konzentration des Standards abgesehen wie in den vorherigen Stoffwechselversuchen. Die Ergebnisse finden sich in der Tabelle 17 und den Abbildungen.

Auch bei diesem Antihistaminikum ist die starke Abhängigkeit der Ausscheidung vom Urin-pH erkennbar. Es fanden sich Anhaltspunkte für das Vorliegen eines Metaboliten, der wegen fehlender Vergleichssubstanz nicht identifiziert werden konnte.

Tab. 17 Verlauf der Ausscheidung bei Versuchsperson v.M. nach Aufnahme von 1 mg Dimetindenmaleat (1 ml Fenistiltropfen) am 6. u. 7. 3. 1974

Uhrzeit	Zeit nach Aufnahme(n)	Urin-Menge in ml	ph ^x	µg/l	Gesamtmenge (µg)
8 ²⁰	-	134	5,8	0	1 ml Fenistil- tropfen
8 ⁵⁵	0				
10 ¹⁵	1,3	124	6,6	4,6	0,6
12 ⁰⁰	3,1	64	5,3	55,6	3,6
15 ³⁰	6,6	118	5,3	69,8	8,2
19 ³⁰	10,6	105	5,0	62,6	6,6
22 ¹⁵	13,3	152	6,5	8,2	1,2
5 ¹⁵	20,3	160	5,3	40,2	6,4
8 ⁴⁵	23,8	168	6,2	9,4	1,6
11 ⁰⁵	26,2	130	6,3	4,2	0,5

xBestimmung mit Glaselektrode

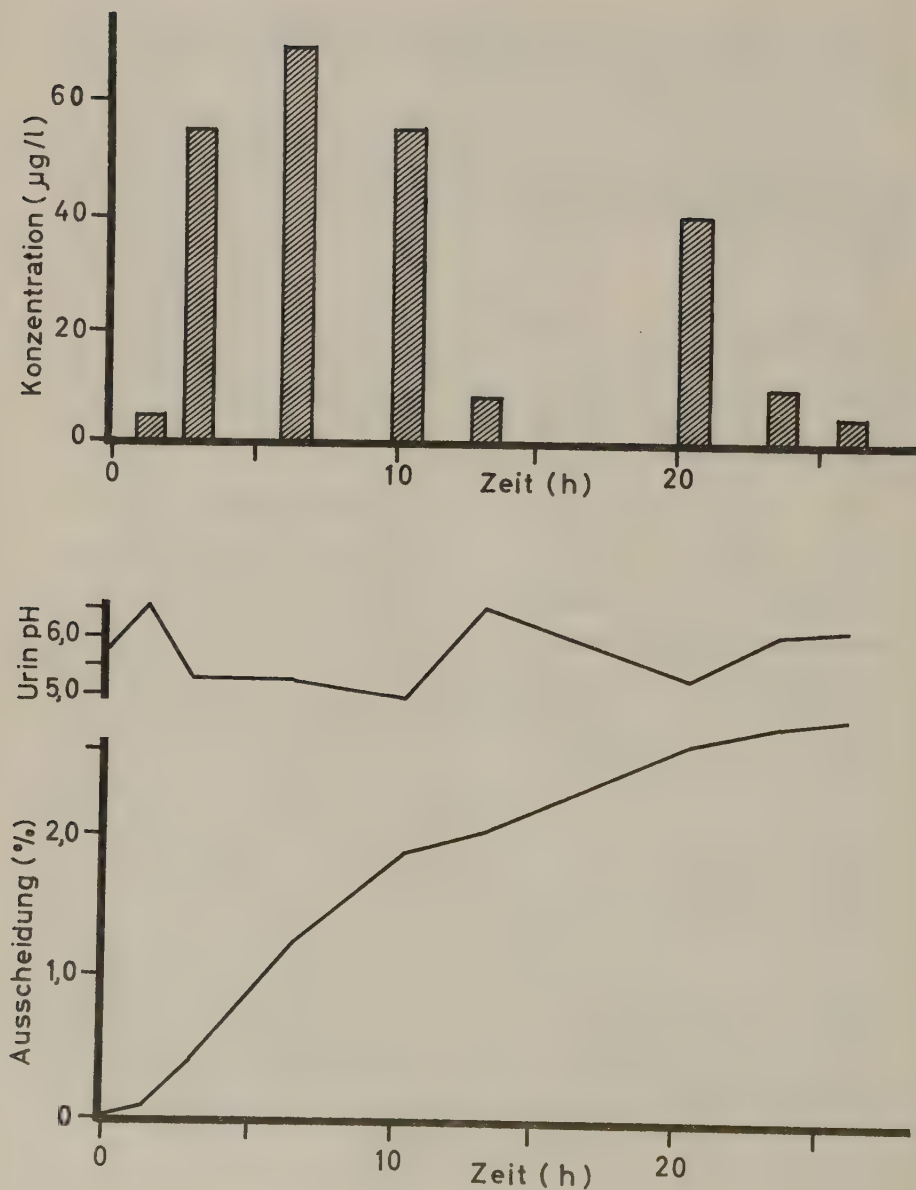


Abb. 30 Ausscheidung von Dimetinden
 oben Konzentration, mitte Urin-pH,
 unten Summe in % der eingenommenen Dosis

3.7. Arbeitsvorschriften

I Extraktion von Antihistaminika aus Spezialitäten und Reinsubstanzen

Eine 20-80 mg Base entsprechende Menge der Zubereitung wird in 50 ml Wasser gegeben und die Lösung mit 10 %iger Schwefelsäure auf pH 1-2 gebracht. Es wird mit 3 x 50 ml Diäthyläther im Scheidetrichter jeweils 3 Minuten ausgeschüttelt. Die organische Phase wird abgetrennt und nach Trocknen über Natriumsulfat eingedampft. Die wässrige Phase wird mit festem Natriumkarbonat alkalisch gemacht (pH 11-12) und ebenfalls mit 3x50 ml Äther ausgeschüttelt. Die gesammelten Ätherextrakte werden durch mehrstündiges Stehenlassen über Natriumsulfat getrocknet und anschließend auf dem Sandbad eingedampft. Die Rückstände der sauren und alkalischen Extraktion werden gewogen.

Beim Vorliegen von Reinsubstanz wird eine 50 mg Base entsprechende Menge des Salzes eingewogen, in 50 ml Wasser gelöst und wie oben beschrieben ausgeschüttelt.

II UV-Spektrophotometrische Bestimmung der Extraktionsausbeute

Der nach I gewonnene Rückstand wird in 10 ml 0,1n HCl aufgenommen, die Lösung im Meßkolben mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und damit eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Extinktionsmessung erfolgt mit dem Einstrahlphotometer PMQII (Zeiss, Oberkochen) in 1 cm Quarzküvetten bei dem in Tabelle 3 angegebenen Hauptmaximum. Dabei soll die Lösung eine Extinktion zwischen 0,1 und 1,0E aufweisen. Aus der Extinktion wird mit Hilfe der in Tabelle 3 angegebenen spezifischen Absorption der Gehalt an freier Base errechnet. Durch Berücksichtigung der Verdünnung erhält man daraus die Menge Arzneistoff im Rückstand.

III Bestimmung der spezifischen Absorption

Von dem handelsüblichen Salz des Antihistaminikums wird eine 100 mg Base entsprechende Menge mit Wasser zu 100 ml gelöst. Von dieser Stammlösung werden weitere Verdünnungen hergestellt. Zur Messung mit dem Einstrahlphotometer PMQ II werden 5-7 Lösungen verschiedener Konzentra-

tion benutzt, die eine Extinktion zwischen 0,1 und 1,0 E aufweisen. Bei der Mehrzahl der geprüften Antihistaminika trifft dies bei Konzentrationen zwischen 10^{-5} und 10^{-6} g Base/ml zu. Für jede gemessene Verdünnung wird aus dem Extinktionswert die spezifische Absorption (E 1 %/1 cm) errechnet. Aus den erhaltenen 5-7 Werten wird das Mittel gebildet.

IV IR-Basenspektren von als handelsübliche Salze vorliegenden Reinsubstanzen

Es wird eine 1 mg Base entsprechende Menge der Reinsubstanz in 5 ml Wasser gelöst und nach Versetzen mit 0,5 g festem Natriumkarbonat dreimal mit 5 ml Äther ausgeschüttelt. Der abgetrennte und mit Natriumsulfat getrocknete Äther wird zu 300 mg Kaliumbromid gegeben und dies in der Suspension fein verrieben. Anschließend wird der Äther bei 35° C im Trockenschrank eingedampft und vom Rückstand in der üblichen Weise ein Preßling hergestellt. Die Spektren werden auf einem IR-Spektrophotometer 221 von Perkin-Elmer aufgenommen.

V Arbeitsbedingungen der Dünnschichtchromatographie

Als Schichtmaterial dient Kieselgel DGF von Riedel de Haen, das mit Wasser angerührt und auf Glasplatten 20 x 20 cm mit einem Dünnschichtstreichgerät der Firma Desaga in einer Dicke von ca. 0,25 mm aufgetragen wird. Anschließend werden die Platten bei Raumtemperatur getrocknet. Von den zu prüfenden Substanzen werden 10-20 µg als freie Base in äthanolischer Lösung aufgegeben. Die Entwicklung erfolgt aufsteigend in Trennkammern mit Schliffdeckel. Nach dem Einfüllen des Fließmittels wird zur vollständigen Sättigung des Dampftraumes eine Stunde gewartet und dann werden zwei Platten mit den Schichten zueinander eingesetzt. Die Laufhöhe der Platten beträgt 10 cm. Es wird bis zu zweimal verwendet. Die Detektion der Substanzflecke erfolgt durch Betrachten im kurzwelligen UV-Licht (Fluoreszenzlöschung) und Anfärben mit Dragendorffs Reagenz nach Munier und Machboeuf.

VI Bestimmung von Antihistaminika im Urin mit Ätherextraktion

5 ml Harn werden in einem 10 ml Zentrifugenglas mit Schliff mit 5 ml Äther versetzt und 0,5 g getrocknetes Natriumkarbonat zugegeben. Nach 5-minütigem maschinellen Schütteln wird 5 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, die Ätherschicht mit einer Pasteurpipette abgenommen und durch ein hydrophobes Filter (597hy der Firma Schleicher und Schüll) gegeben. Das Filter wird mit Äther nachgespült und der Extrakt in einem unten spitz zulaufenden Reagenzglas im Wasserbad bei 37° C eingedampft. Der Rückstand wird in 100 µl Äthanol aufgenommen. Davon werden 1-2 µl eingespritzt. Im Anschluß an das Chromatogramm des Urinextraktes wird zur Bestimmung der Retentionszeit eine frische ätherische Lösung der Reinsubstanz aufgegeben.

VII Bestimmung von Antihistaminika im Urin mit Dichlormethanextraktion

5 ml Harn und 5 ml Dichlormethan werden im 10 ml Schliffglas mit 0,1 ml gesättigter Natronlauge alkalisiert und 5 min geschüttelt. Anschließend wird bei 5000 U/min zentrifugiert und die obere Urinschicht mit einer Pasteurpipette abgehoben. Der Extrakt wird zweimal mit 5 ml Wasser gewaschen und nach sorgfältigem Entfernen des Wassers das Dichlormethan auf ein hydrophobes Filter gegeben und der Extrakt bei 42° C im Wasserbad eingedampft. Der Rückstand wird in 100 µl Äthanol aufgenommen und davon 1-3 µl eingespritzt.

VIII Bestimmung von Antihistaminika mit Pentan/2-Methylbutanol(1)extraktion

5 ml Urin werden in einem Reagenzglas mit Schliff mit 0,1 ml internem Standard, Cyproheptadin-HCl (10 µg/ml bzw. 1µg/ml), und mit 5 ml Pentan/2-Methylbutanol(1) 99:1 versetzt, mit 0,1 ml 25 % Ammoniaklösung alkalisch gemacht und 5 min ausgeschüttelt. Es wird 3 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert und die obere organische Schicht mit einer Pasteurpipette abgenommen und in einem unten spitzzulaufenden Reagenzglas bei 38° C nach Zugabe von 0,1 ml n-Propanol im Wasserbad eingedampft. Der Rückstand wird in 50-100 µl n-Propanol aufgenommen. Davon werden 1-3 µl eingespritzt.

4. DISKUSSION

Mit der vorliegenden Arbeit sollten Methoden entwickelt werden, die den Nachweis von Antihistaminika im biologischen Medium auch bei therapeutischer Dosierung gestatten.

In der Literatur sind verschiedene Nachweisverfahren veröffentlicht worden, die zum Teil nur an Reinsubstanzen erprobt wurden, unspezifisch oder unempfindlich sind oder nur für den Nachweis weniger Stoffe angelegt sind.

In dieser Arbeit wurden für die in der Bundesrepublik gebräuchlichen Antihistaminika mit Ausnahme der Phenothiazinderivate analytische Daten der Dünnschichtchromatographie, UV- und Infrarotspektrophotometrie bestimmt. Diese Verfahren sind zur Identifizierung bei Vergiftungsfällen gut geeignet. Zum Nachweis bei therapeutischer Dosierung reicht die Empfindlichkeit in der Regel nicht aus. Diese geringen Mengen können jedoch mit Hilfe der Gaschromatographie erfaßt werden. Wenn ein empfindlicher und spezifischer Detektor verwandt wird, genügt eine einfache Probenvorbereitung. Mit den gebräuchlichen Extraktionsmitteln werden aus Harn Begleitsubstanzen mit-extrahiert, die die Bestimmung im Nanogrammbereich stören. Wird wie üblich der Extrakt zur Trockne eingedampft, tritt irreversible Adsorption an der Glaswand auf.

Mit dem hier angegebenen Lösungsmittelgemisch lassen sich diese Schwierigkeiten vermeiden^x. Es werden sowohl Substanzverluste vermieden als auch bedeutend weniger Begleitstoffe extrahiert. Der Coffeingehalt, der in den üblichen Extrakten den Hauptanteil der Störsubstanzen stellte, ist auf einen geringen Bruchteil gesenkt.

Das Verfahren ist schnell und einfach durchzuführen. Die Eignung der Methode zur gaschromatographischen Bestimmung therapeutischer Dosen wurde für drei Antihistaminika gezeigt, deren Ausscheidung im 24 Stundenurin untersucht wurde. Konzentrationen bis hinab zu 4 ng/ml waren bestimmbar.

Bei den Stoffwechseluntersuchungen wurde nur die Ausscheidung der unveränderten Substanz bestimmt. Bei Dimetinden fanden sich Anhaltspunkte für

^x Nach Abschluß der Untersuchungen erschien eine Arbeit von BREIMER et al. (18), in der sie über die Verwendung eines Petroläther/Amylalkohol (100:2) Gemisches zur Bestimmung von Hexobarbital im Plasma berichten.

das Vorliegen eines Metaboliten, der wegen fehlender Vergleichssubstanz nicht identifiziert werden konnte.

Das hier angegebene Verfahren ist zum empfindlichen und spezifischen Nachweis geringer Mengen von Bamipin, Chlorphenoxamin und Dimetinden im biologischen Medium geeignet. Inwieweit es für andere basische Stoffe einsetzbar ist, muß noch geprüft werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird über analytische Verfahren zum Nachweis über Antihistaminika berichtet. Die Infrarot- und Ultraviolettabsorptionsmaxima von 28 in der Bundesrepublik Deutschland gebräuchlichen Antihistaminika wurden mitgeteilt und die in den einschlägigen Handbüchern nicht vorkommenden IR-Spektren abgebildet. Zur dünnschichtchromatographischen Trennung der Antihistaminika wurden in der Literatur angegebene Fließmittel benutzt und die am besten geeigneten ausgewählt.

Ein Nachweis dieser Stoffe nach therapeutischer Dosierung gelingt in der Regel nur mit Hilfe der Gaschromatographie. Das Verhalten der Antihistaminika auf sechs stationären Phasen wurde untersucht. Die besten Ergebnisse hinsichtlich Peakform und Trennung wurden mit SP1000, SP2250 und OV 225 erzielt. Zum Nachweis im biologischen Medium ist ein spezifischer Detektor vorteilhaft. Die Empfindlichkeit von Thermoionik- und Elektroneneinfangdetektor für die hier behandelten Antihistaminika wurde verglichen und der TID wegen der konstanten Empfindlichkeit für stickstoffhaltige Substanzen ausgewählt. Mit diesem Detektor wurde die Ausscheidung von 26 Antihistaminika im menschlichen Urin untersucht. Dieser Nachweis wurde durch mitextrahierte Begleitsubstanzen gestört.

Beim Versuch, für drei Substanzen die während 24 Stunden unverändert ausgeschiedenen Mengen festzustellen, zeigte sich, daß mit den herkömmlichen Verfahren irreversible Adsorption am Glas auftritt. Mit dem Gemisch Pentan/2-Methyl-1-butanol 99:1 wurde ein Extraktionsmittel gefunden, das ein schnelles und einfaches Verfahren erlaubt. Seine Wirksamkeit zeigte sich bei der Bestimmung der 24 Stunden Ausscheidung von Bamipin, Chlorphenoxamin und Dimetinden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aellig, W.H., Kalberer, F. u. Nüsch, E., persönliche Mitteilung, Sandoz 1972
2. Alber, L.L., J.A.O.A.C. 52, 1295 (1969)
3. Albert, K. u. Windheuser, J.J., J. Pharm. Sci. 57, 2085 (1968)
4. Allen, E.A. u. Das Gupta, V., Amer. J. Hosp. Pharm. 30, 77 (1973)
5. Aue, W.A., Gehrke, C.W., Tindle, Q.C., Stalling, D.L. u. Ruyle, C.D., J. Gas Chromatogr. 5, 381 (1967)
6. Auterhoff, H., Arch. Pharm. 283, 244 (1950)
7. " Arch. Pharm. 284, 123 (1951)
8. " Arch. Pharm. 285, 14 (1951)
9. Awe, W., u. Schulze, W., Pharm. Ztg. 107, 1333 (1962)
10. Bandelin, F.J., Slifer, E.D. u. Pankrat, R.E., J. Amer. Pharm. Ass. 39, 277 (1950)
11. Beckett, A.H. u. Moffat, A.C., J. Pharm. Pharmacol. 20, 485 (1968) ✓
12. Beckett, A.H. u. Wilkinson, G.R., J. Pharm. Pharmacol. 17, 256 (1965)
13. Benstz, W., Klin. Wschr. 29, 663 (1951)
14. " Ärztl. Forsch. 7, 139 (1963)
15. Blazek, J. u. Stejskal, Z., Pharmazie 12, 409 (1957)
16. Boonen, F., J. Pharm. Belg. 27, 233 (1972)
17. Brandstätter-Kuhnert, M., Hoffmann, R. u. Senn, M., Microchem.J. 7, 357 (1963)
18. Breimer, D.D. u. van Rossum, J.M., J. Chromatogr. 88, 235 (1974)
19. Brodie, B.B. u. Udenfried, S.J., J. Biol. Chem. 158, 705 (1945)
20. Bruce, R.B., Pitts, J.E. u. Pinchbeck, F.U., Analytic. Chem. 40, 1246 (1968)

21. Bruce, R.B., Turnbull, L.B., Newmann, J.H. u. Pitts, J.E.,
J. Med. Chem. 11, 1031 (1968)
22. Brügel, W., Einführung in die Ultrarotspektroskopie, 4. Auflage,
Steinkopff, Darmstadt 1969
23. Burns, J.J. u. Phillips, A.P., Federation Proceedings 25, 418
(1966)
24. Burtis, C.A. u. Warren, K.S., Clin. Chem. 14, 290 (1968)
25. Cavalitto, C.J., Chafetz, L. u. Miller, L.D., J. Pharm. Sci. 52,
259 (1963)
26. Celeste, A.C. u. Polito, M.V., J.A.O.A.C. 49, 541 (1966)
27. Celeste, A. u. Turczan, J., J.A.O.A.C. 46, 1055 (1963)
28. Chambon, P. u. Chambon-Mougenot, R., C.R. Acad. Sc. Paris,
t. 268, 596D (1969)
29. Cheng-Chun Lee, Toxicol. Appl. Pharmacol. 8, 210 (1966)
30. Clarke, E.G.C., J. Pharm. Pharmacol. 9, 752 (1957)
31. " Isolation and Identification of Drugs, The Pharma-
ceutical Press, London 1969
32. Cochin, J. u. Daly, J.W., J. Pharmacol. Exptl. Therap. 139, 160
(1963)
33. Comer, J.P. u. Comer, I., J. Pharm. Sci. 56, 413 (1967)
34. Cometti, A., Bagnasco, G. u. Maggi, N., J. Pharm. Sci. 60,
1074 (1971)
35. Cornish, H.H. u. Christman, A.A., J. Biol. Chem. 228, 315 (1967)
36. Cuypers, J., Dissertation Heidelberg 1971
37. Dailey, R.E., Way, E.L., Parikh, J.R., Song, C.Y. u. Howie,
D.L., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 74, 394 (1950) nach
Stolman, A., Progress in Chemical Toxicology, Vol 2, 92, Acade-
mic Press, New York and London 1965
38. Davidow, B., Li Petri, N. u. Quame, B., Am. J. Clin. Path. 50,
714 (1968)

39. Diekmann, L., Hösemann, R. u. Dibbern, H.W., Arch. Toxikol. 29, 317 (1972)
40. Dill, W.A. u. Glazko, A.J., J. Biol. Chem. 179, 395 (1949)
41. Donike, M., Jaenicke, L., Stratmann, D. u. Hollmann, W., J. Chromatogr. 52, 237 (1970)
42. Drach, J.C. u. Howell, J.P., Biochem. Pharmacol. 17, 2125 (1968)
43. El Gendi, S., Kisser, W. u. Machata, G., Mikrochem. Acta 120 (120)
44. Fike, W. u. Sunshine, J., Analytic. Chem. 37, 127 (1965)
45. Fike, W.W., Analytic. Chem. 38, 1697 (1966)
46. Finkle, B.S., Cherry, E.J. u. Taylor, D.M., J. Chromatogr. Sci. 9, 393 (1971)
47. Fischer, H., Eulenhöfer, H.G. u. Kraft, R., Arzneimittelforschung 21, 1692 (1971)
48. Fontan, C.R., Shmith, W.C. u. Kirk, P.L., Analytic. Chem. 35, 591 (1963)
49. Fulton, C.C., Modern Microcrystal Tests for Drugs, The Identification of Organic Compounds by Microcrystalloscopic Chemistry, Wiley-Interscience, New York, London, Sydney, Toronto (1969)
50. Gänshirt, H., Arzneimittel in Stahl, E., Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1962
51. Giebelmann, R., u. Gibb, B., Arch. Toxikol. 20, 253 (1964)
52. Glazko, A.J. u. Dill, W.A., J. Biol. Chem. 179, 403 (1949)
53. Glazko, A.J., Mc Ginty, D.A., Dill, W.A., Wilson, M.L. u. Ward, C.S., J. Biol. Chem. 179, 409 (1949)
54. Gloria, T.S., Rev. Fac. Farm. Bioquim. Univ. Sao Paulo 6, 63 (1968)
55. Göbbeler, K.H., Dtsch. Apotheker Ztg. 111, 1291 (1971)
56. Goenechea, S., J. Chromatogr. 36, 375 (1968)

57. Goodman, H., La Monde, A., Banker, G.S. u. Knevel, A.M.,
Canad. J. Pharm. Sci. 6, 70 (1970)
58. Gough, T.A. u. Sugden, K., J. Chromatogr. 86, 65 (1973)
59. Gupta, B.K., Gufta, S. u. De Souza, J.J.V., Ind. J. Pharmacy
33, 38 (1971)
60. Häussler, A. u. Hajdu, P., Arzneimittel-Forsch. 12, 411 (1962)
61. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Bd. I, Antihistami-
nika, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967
62. Hald, J., Acta Pharmacol. 3, 296 (1947)
63. Hardmeier, E. u. Schmidlin-Mészáros, J., Arch. Toxikol. 21,
131 (1965)
64. Hattori, T., Kawai, S. u. Nishiumi, M., Bunseki Kagaku 14, 586
(1965)
65. Hauck, G. u. Schmidt, J., Beitr. Gerichtl. Med. XXXI, 333 (1973)
66. Heider, J.G. u. Schwarz, H.J., Persönliche Mitteilung Sandoz 1970
67. Hugosson, S., Nyberg, L. u. Nilsson, L., Acta Pharmac. Suecia
9, 249 (1972)
68. Jain, N.C. u. Kirk, P.L., Mikrochem. J. 12, 242 (1967)
69. Jochum, K., Patscheider, H. u. Scheibl, F., Arch. Toxikol. 16,
(1957)
70. Kabasakalian, P., Taggart, M. u. Townley, E., J. Pharm. Sci.
57, 621 (1968)
71. Kaiser, R., Chromatographie in der Gasphase III, 1
Bibliographisches Institut, Mannheim/Zürich, 2. Auflage 1969
72. Kamm, J.J., Firulio, C.R., Miller, D. u. van Loon, E.J.,
Biochem. Pharmacol. 18, 659 (1969)
73. Karlson, P., Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 5. Aufl., Georg
Thieme Verlag, Stuttgart 1969
74. Kawai, S. u. Hashiba, S., Eisei Shikensho Hokoku 82, 67 (1964)
75. Kazyak, L. u. Knoblock, E.C., Analytic. Chem. 35, 1448 (1963)

76. Kleckner, L.J. u. Osol, A., J. Am. Pharm. Ass. XLIV, 762 (1955)
77. Koike, H., Ohashi, K., Miyakata, A. u. Matsuo, M., Japan Analyst 17, 608 (1968)
78. Küchlin, R. Dissertation Bonn 1971
79. Kuntzmann, R., Klutch, A., Tsai, I. u. Burns, J.J., J. Pharmacol. Exptl. Therap. 149, 29 (1965)
80. Lässig, W. u. Pester, F., Kinderärztl. Praxis 39, 494 (1971)
81. Lange, W.E., Theodore, J.M. u. Pruyn, F.J., J. Pharm. Sci. 57, 124 (1968)
82. Lembeck, F., Lipp, W. u. Maresch, W., Arch. Toxikol. 18, 93 (1960)
83. Luders, R.C., Williams, J., Fried, K., Rehm, C.R. u. Tishler, F., J. Agr. Food Chem. 18, 1153 (1970)
84. Mac Donald, A. u. Pflaum, R.T., J. Pharm. Sci. 52, 816 (1963)
85. " J. Pharm. Sci. 53, 887 (1964)
86. Macek, K. u. Vecerkova, J., Pharmazie 20, 605 (1965)
87. Machata, G., Arch. Toxikol. 18, 124 (1960)
88. Matsui, F., Watson, J.R. u. French, W.N., J. Chromatogr. 44, 109 (1969)
89. Mc Gavack, T.H., Dreker, I.J., Schutzer, S. u. Heisler, A., J. Allergy 19, 251 (1948)
90. Meyer, E., persönliche Mitteilung, Chemiewerk Homburg (1960)
91. v. Meyer, L. u. Hauck, G., Beitr. gerichtl. Med. XXIX, 408 (1972)
92. Moffat, A.C., Stead, A.H. u. Smalldon, K.W., J. Chromatogr. 90, 19 (1974)
93. Moldenhauer, E. u. Kupatz, H., Dtsch. Gesundh.-Wes. 25, 231 (1970)
94. Mulé, S.J., J. Chromatogr. 55, 255 (1971)

95. Mulé, S.J., Bastos, D., Jukofsky, D. u. Saffer, E., J. Chromatogr. 63, 289 (1971)
96. Narrod, S.A., Wilk, A.L. u. King, C.T.G., J. Pharmacol. Exptl. Therapeut. 147, 380 (1965)
97. Neuhoff, E.W. u. Auterhoff, H., Arch. Pharm. 268, 400 (1955)
98. Nikolic, K. u. Cupic, Z., Acta Pharm. Jug. 21, 159 (1971)
99. Nürnberg, E., Arch. Pharm. 292 (64), 610 (1959)
100. O'Dea, A.E. u. Liss, M., New England J. Med. 249, 566 (1953), zitiert nach Stolman, A., Progress in Chemical Toxicology, Vol. 1, 177, Academic Press, New York, London, 1963
101. Ohashi, K., Matsuo, M., Kawasaki, A. u. Koike, H., Japan Analyst 17, 843 (1968)
102. Osol, A. u. Sideri, C.N., J. Amer. Pharm. Ass. XLIV, 761 (1955)
103. Pantlitschko, M., Bengner, H. u. Schmid, J., Mikrochem. Acta 34, 289 (1949)
104. Peets, E.A., Jackson, M. u. Symchowicz, S., J. Pharmacol. Exptl. Ther. 180, 464 (1972)
105. Pellerin, F. u. El Makkawi, H., Ann. Pharm. Franc. 29, 421 (1971)
106. Perlman, E., J. Pharmacol. Exptl. Therap. 95, 465 (1949)
107. Persson, C.G.A. u. Ekman, M., Acta Pharm. Suecia 9, 229 (1972)
108. Pfandl, K., Dtsch. Apoth. Ztg. 103, 365 (1963)
109. Plummer, A.J., Federation Proceedings 8, 325 (1949)
110. Posner, H.S., Graves, A., King, C.T.G. u. Wilk, A., Federation Proceedings 25, 418 (1966)
111. Rader, B.R., J. Pharm. Sci. 58, 1535 (1969)
112. Reisch, J., Alfes, H. u. Möllmann, H., Pharmazie 23, 245 (1968)
113. Reiss, T.J., J.A.O.A.C., 53, 609 (1970)
114. Rieders, F. u. Cordova, V. in Stolman, A., Progress in Chemical Toxicology, Vol. 1, 194, Acad. Press, New York 1963

115. Rink, M. u. Riemhofer, M., Mitt. dtsch. pharmaz. Ges. 31, 197 (1961)
116. Schirmer, R.E. u. Pierson, R.J., J. Pharm. Sci. 62, 2052 (1973)
117. Schmidt, G. u. Schoyerer, R., Dt. Z. ges. gerichtl. Med. 57, 402 (1966)
118. Schmidt, J., Dissertation Freiburg 1970
119. Schneider, P. u. Wässer, St., Kinderärztl. Praxis 39, 530 (1971)
120. Scott, N., J. Pharm. Sci. 53, 1121 (1964)
121. Siegert, E., Kinderärztl. Praxis 39, 557 (1971)
122. Smith, D.J., J.A.O.A.C. 55, 596 (1972)
123. Snyder, F.H., Klahm, G.R. u. Werner, H.W., J. Amer. Pharmaceut. Ass. 37, 420 (1948)
124. Sorg, A., Pharmazie 11, 24 (1956)
125. Stahl, E., Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York,, 2. Aufl. 1967
126. Steele, J.W., Bolan, M. u. Eyolfson, J.K., Canad. J. Pharm.Sci. 5, 107 (1970)
127. Stevens, H.M. u. Evans, P.D., Acta pharmacol. et toxicol. 32, 525 (1973)
128. Townley, E., Perez, I. u. Kabasakalian, P., Analytic. Chem. 42, 1759 (1970)
129. Vecerkova, J., Sulkova u. Kacel, Pharmazie 17, 22 (1962)
130. Vidic, E., Arch. Toxikol. 27, 19 (1970)
131. Vidic, E. u. Schütte, J., Arch. Pharm. 295, 342 (1962)
132. Waldi, D., Dünnschichtchromatographie in Graf, E. u. Preuss, R., Gadamers Lehrbuch der chem. Toxikologie und Anleitung zur Ausmittelung der Gifte, Bd. II, Verlag Vandenhoeck u. Ruprecht, Göttingen, 3. Aufl. 1966
133. Waldi, D., Munter, F. u. Schnackerz, K., J. Chromatogr. 6, 61 (1961)

134. Wallace, J.R. . Biggs, J.D. u. Dahl, E.V., *Analytic. Chem.* 38, 831 (1966)
135. Walle, T. u. Ehrsson, H., *Acta Pharm. Suecia* 8, 27 (1971)
136. Way, E.L. u. Dailey, R.E., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73, 423 (1950)
137. Weinman, E.O. u. Geissman, T.A., *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 125, 1 (1959)
138. Widmann, A., Eiden, F. u. Tenczer, J., *Arzneim.-Forsch.* 20, 283 (1970)
139. Wilczyńska, I., *Chem. Anal. (Warsaw)* 18, 319 (1973)
140. Wilson, D.L., Wirz, D.R. u. Schenk, G.H., *Analytic. Chem.* 45, 1447 (1973)
141. Wolf, M.H., *Dissertation Freiburg* 1973
142. Woo, D., Yen, J.K. u. Heimlich, K.R., *J. Pharm. Sci.* 62, 1993 (1973)
143. Würmli, K., *Pharm. Acta Helvet.* 48, 200 (1973)
144. Yalcindag, O.N. u. Onur, E., *Pharm. Zentralhalle* 108, 405 (1969)
145. " *Sci. Pharm.* 37, 163 (1969)
146. Zakrewski, Z. u. Zapor, S., *Farmacja Polska* 11, 917 (1970)
147. Zyma-Blaes, persönliche Mitteilung 1962

Lebenslauf

- 27.11.1942 Geboren in Bad Elster/Sa.
 Vater: Dr. med. Kurt v. Meyer, prakt. Arzt
 Mutter: Irene v. Meyer, geb. Ludwig
- 1949 - 1953 Besuch der Volksschule in Haßlinghausen
 1953 - 1962 Besuch des Städt. Gymnasium in Gevelsberg
 26.2.1962 Abitur in Gevelsberg
 April 1962 - März 1964 Praktikant in der Ratsapotheke in Gevelsberg
 20.3.1964 Pharmazeutische Vorprüfung in Arnberg
 WS 1964/65 - Studium der Pharmazie an der Universität
 WS 1967/68 Erlangen-Nürnberg
 14.3.1968 Pharmazeutische Staatsprüfung in Erlangen
 April 1968 - Kandidat in der Ratsapotheke Gevelsberg
 Oktober 1968
 ab Okt. 1968 Doktorand bei Prof. Dr. G. Hauck am Institut
 für Gerichtliche- und Versicherungsmedizin der
 Universität Freiburg
- 18.11.1969 Approbation, Bay. Staatsministerium des Innern,
 München
- seit 1.1.1970 wissenschaftlicher Angestellter am Institut für
 Rechtsmedizin der Universität München, dort
 Fortsetzung der Promotion unter Anleitung von
 Prof. Dr. G. Hauck
- 3.9.1971 Eheschließung mit Renate Kohmann aus Allersberg
- 1.2.1973 - Ableistung des Grundwehrdienstes im Flugmedizi-
 30.4.1974 nischen Institut der Luftwaffe Fürstenfeldbruck

